



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (27)

2701- Selon l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé), les maladies parodontales peuvent être définies comme des maladies infectieuses multifactorielles. Elles sont caractérisées par des symptômes et des signes cliniques qui peuvent inclure une inflammation visible ou non, des saignements gingivaux spontanés ou provoqués d'importance variable, la formation de poches en rapport avec des pertes d'attache et d'os alvéolaire, une mobilité dentaire et peuvent conduire à des pertes de dents.

L'Académie Américaine de Parodontologie propose, en 1999, une classification de ces pathologies dans laquelle on distingue deux grands types d'atteinte des tissus de soutien de la dent: les gingivites, pour lesquelles l'inflammation se limite à la gencive et est réversible avec une bonne hygiène et les parodontites pour lesquelles l'inflammation s'étend aux autres tissus de soutien de la dent à savoir le ligament alvéolo-dentaire, le cément et l'os alvéolaire.

Le présent projet porte sur l'évaluation d'un traitement visant à inhiber localement l'action d'un facteur de transcription impliqué dans les phénomènes inflammatoires et la destruction des cellules.

Le modèle utilisé est le rat avec une parodontite induite sur une seule dent. Au total 100 rats seront utilisés. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables, en évaluant jusqu'à 6 traitements différents. Ce nombre pourra être diminué en fonction des résultats et du nombre de produits réellement évalués.

La voie d'administration intra-gingivale a été retenue car il s'agit de celle qui serait utilisée chez l'Homme.

Aucun effet secondaire n'est attendu, mais les animaux seront observés tous les jours, et pesés au moins 1 fois par semaine, par du personnel spécialement formé.

Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort léger (pose d'une ligature à la base d'une dent, et injections dans la gencive) et seront réalisées sous anesthésie. Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition: blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids...

Le principal bénéfice attendu de ces études est l'obtention de données satisfaisantes démontrant la capacité des traitements à inhiber localement l'action du facteur de transcription impliqué dans les mécanismes de la parodontite, et ainsi pouvoir proposer des solutions efficaces aux malades.

2702- Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes chez l'adulte. Il n'existe pas actuellement de traitement permettant de guérir ces tumeurs, et malgré l'efficacité partielle de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie, l'affection est souvent fatale en quelques mois. Le développement de nouveaux traitements nécessite une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la survenue du glioblastome et des tests pharmaceutiques sur des modèles animaux afin d'identifier de nouveaux traitements potentiels et d'évaluer leur efficacité.

Des modèles de glioblastome humain greffés en sous cutané chez la souris nude (immunodéficiente) ont d'abord été développés dans des études précédentes. Ils ont permis de réaliser des études moléculaires afin d'identifier les acteurs participant à la survenue et la récurrence du glioblastome. Ils ont également permis de réaliser des tests pharmaceutiques pour valider/évaluer l'efficacité de traitements potentiels.

Avant d'appliquer ces traitements à l'homme, leur efficacité doit maintenant être testée sur des modèles plus complexes, avec une implantation de la tumeur sur son site d'origine : dans le cerveau (en intracérébral).

En effet l'efficacité des agents thérapeutiques utilisés peut être différente en intracérébral en raison de la présence d'une barrière hématoencéphalique, plus ou moins altérée dans le cas d'un glioblastome. Seuls les traitements ayant démontrés leur efficacité sur culture cellulaire puis sur des modèles sous-cutanés (peu invasifs) seront testés sur des modèles intracérébraux. Nous nous proposons de développer 5 modèles intracérébraux (plus une étude préliminaire) au cours desquels des cellules de glioblastome humain seront injectées en intracérébral chez des souris athymiques (nude), c'est à dire immunodéficientes. Pour caractériser les modèles obtenus, nous testerons la reproductibilité de la croissance tumorale d'une expérimentation à

l'autre, ce qui nécessitera de reproduire et d'étudier la croissance tumorale lors de 3 expérimentations indépendantes pour chaque modèle. La croissance tumorale et l'efficacité des traitements seront évalués par imagerie optique et par imagerie scanner (CT et μ CT).

Si au-delà de 3 mois après l'implantation des cellules tumorales, aucun signe de souffrance n'est détecté chez les souris, ces dernières seront mises à mort et une étude histologique sera réalisée afin de déterminer si une tumeur est présente et le cas échéant de quel volume.

Une étude préliminaire utilisant 8 souris sera réalisée afin de choisir les méthodes d'analyse les plus appropriées.

Puis pour chaque étude, 12 à 24 souris par groupe (maximum 3 groupes) seront implantées (ce nombre dépendra de l'hétérogénéité de la croissance tumorale observée lors de la première série d'implantation). Le développement et la caractérisation des 6 études nécessiteront donc au total l'utilisation de 368 souris maximum pour ce projet.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc.

Le recours à l'imagerie permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés en conservant chaque individu tout au long de l'étude, sans procéder à des mises à mort régulières. Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période d'acclimatation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel de nidification spécifique.

La douleur potentielle des animaux sera évitée en réalisant les actes techniques (chirurgie, imagerie) sous anesthésie générale et en réalisant des injections d'antalgiques journalières suite à l'opération.

2703- Les synapses du système nerveux central, organisées en réseau, assurent la transmission normale des informations dans le cerveau. Les récepteurs du glutamate (mGluRs) participent à la modulation de cette transmission dans tout le système nerveux central, chez l'Homme comme chez la souris. La localisation stratégique de ces récepteurs en font des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes. En particulier, le récepteur mGlu7 est connu pour participer dans l'épilepsie, l'addiction et la schizophrénie depuis long temps. Cependant, aucune drogue spécifique n'existait jusqu'à récemment pour cibler le récepteur. Lors de cette étude nous allons pouvoir utiliser des nouveaux composés pharmacologiques très sélectifs développés par un laboratoire académique de chimie. Ces composés seront testés lors d'expériences visant à comprendre comment un cerveau normal devient épileptique suite à différents traitements. Nous allons réaliser des expériences de comportement couplées à des mesures de l'activité cérébrale (vidéo-électroencéphalogramme ou vidéo-EEG) chez la souris normale, la souris dont le récepteur mGlu7 est absent et la souris où le récepteur mGlu7 est partiellement inactivé, ainsi que chez des modèles de souris permettant de suivre l'expression des gènes dans des populations cellulaires spécifiques. Les objectifs principaux de notre étude sont de savoir 1) si l'activation de mGlu7 peut freiner ou améliorer l'apparition de crises épileptiques spontanées; 2) si la mutation de mGlu7 prédispose le cerveau aux crises épileptiques; 3) quels gènes sont exprimés lors du processus d'épileptogenèse dans des sous-types neuronaux d'intérêt.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux car elle adresse des mécanismes physiopathologiques complexes qui ne peuvent pas être récapitulés par des modèles plus simple (ex. culture de neurones). Douze animaux de chaque génotype seront utilisées pour chaque condition, mais là où il sera possible les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs manipulations (ex. tests cognitifs, localisation de mGlu7) afin de minimiser le nombre d'animaux nécessaires. Nous estimons à 740 souris le nombre total de souris utilisé sur 4 ans.

Les animaux seront hébergés en groupe sauf lors de l'implantation des dispositifs nécessaires pour enregistrer l'activité cérébrale, afin d'éviter le risque de blessure mutuelle (par ex. connecteurs arrachés). L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement par les expérimentateurs et tout signe de détresse ou problème de santé adressés au plus vite.

Cette étude nous permettra de proposer mGlu7 comme candidat potentiel pour le ciblage d'une pathologie très invalidante telle l'épilepsie.

2704- Dans le cadre des changements globaux attendus, il est urgent d'appréhender le devenir des écosystèmes et de la biodiversité qu'ils hébergent. L'étude des conséquences des fluctuations environnementales sur les traits phénotypiques des organismes, ainsi que celle des stratégies adaptatives et de la dynamique des populations qui en découle, sont fondamentales. Les écosystèmes polaires montrent une vulnérabilité aux changements globaux bien plus intense que les autres écosystèmes. Or l'Océan Austral héberge l'un des écosystèmes les plus productifs de notre planète. Avec une production primaire marine qui représente environ 15% de la production marine mondiale, il héberge les plus importantes communautés d'oiseaux marins. Ces communautés diminuent cependant de manière très inquiétante et ce parallèlement à une diminution de la production marine secondaire dans les eaux antarctiques.

Dans ce contexte, et grâce à un suivi électronique des manchots (depuis la fin des années 90, près de 15,000 individus ont été marqués au moyen de petites puces électroniques sans batterie de moins d'un gramme, appelées transpondeurs, et sont suivis sur le long terme), notre projet ECOPHY-P137 a pour principal objectif la compréhension des processus écologiques et évolutifs qui façonnent les populations, et notamment les capacités d'adaptation des organismes face aux contraintes de leur environnement. Nous nous intéressons à la plasticité phénotypique et aux mécanismes microévolutifs, deux processus par lesquels les traits phénotypiques au sein d'une population sont capables de s'ajuster aux changements du milieu. La dynamique spatio-temporelle des populations est également traitée à différentes échelles, de la colonie aux écosystèmes. A

l'interface entre l'écologie évolutive, la génétique et la dynamique des populations, notre projet favorise le développement de modèles mathématiques globaux. Ces derniers permettront à terme de comprendre les liens existants entre les modifications survenant dans l'environnement et les trajectoires spatio-temporelles de ces populations. Les modèles prédictifs obtenus nous informeront sur l'évolution de la composante biologique de l'Océan Austral et nous permettront de mettre en place des stratégies de conservation et de gestion durables de la biodiversité et des ressources naturelles.

Les axes de recherche de notre programme 137 ECOPHY sont donc les suivants :

- 1- Evaluer les réponses individuelles et les limites des capacités d'adaptation des populations face aux contraintes environnementales. Nous nous intéressons aux forces sélectives affectant ces populations aussi bien sur leurs lieux d'alimentation en mer que sur le site de reproduction à terre.
- 2- Déterminer l'origine de la variabilité phénotypique. Nous cherchons à identifier la part héritable des traits phénotypiques clés chez ces espèces tout en vérifiant si la plasticité de ces traits est ou non sous contrôle génétique.
- 3- Modéliser et prédire les réponses évolutives des populations aux changements environnementaux en intégrant, d'une part, la multiplicité et, d'autre part, la complexité des mécanismes entre les réponses des traits phénotypiques des individus (plasticité/microévolution) et la dynamique spatio-temporelle des populations.
- 4- Réaliser les 3 objectifs précédents en développant des méthodologies adaptées qui n'impactent pas les individus et les populations.

Sont principalement étudiées trois espèces figurant parmi les principaux prédateurs supérieurs des écosystèmes marins de l'Océan Austral (le manchot royal *Aptenodytes patagonicus*, le manchot Adélie *Pygoscelis adeliae*, et le manchot empereur *Aptenodytes forsteri*). Par leur distribution géographique, leur mode de reproduction et leur phénologie, elles permettront en effet d'aborder de manière très complémentaire les différentes contraintes par lesquelles la variabilité climatique et son impact sur les ressources marines s'expriment dans l'Océan Austral. Des études de génétique des populations de 3 autres espèces de manchots (le manchot papou *Pygoscelis papua*, le gorfou sauteur *Eudyptes filholi* et le gorfou macaroni *Eudyptes chrysolophus*) sont également réalisées dans le cadre de collaborations avec des collègues chiliens, brésiliens, norvégiens et anglais. Les effectifs prévisionnels d'animaux utilisés dans ce projet sont de 2730 animaux vivants.

L'originalité de notre approche est, entre autres, de s'appuyer sur des méthodologies innovantes développées grâce à l'essor de nouvelles technologies afin d'éviter ou de limiter les perturbations, liées à l'homme, des animaux dans leur milieu naturel dans le respect de la règle des 3R. Ces innovations technologiques permettent, par exemple, d'identifier les animaux dans leur milieu naturel sans le biais de l'impact du baguage, en particulier en utilisant des antennes RFID montées sur des engins radiocommandés ou bien des systèmes de caméras synchronisées aux systèmes de détections automatiques. Ces approches ouvrent de nouvelles perspectives de recherche : celles de l'étude de la structure des colonies d'oiseaux marins en fonction des caractéristiques des individus (âge, expérience, relations sociales, lieu de naissance, etc.) et en fonction des conditions environnementales à terre et en mer (i.e. en fonction des ressources marines dont nous savons maintenant qu'elles sont très sensibles à une faible variation de température).

2705- Un nouveau modèle génétique murin de pathologie du squelette osseux est proposé, à l'interface entre recherche fondamentale sur l'homéostasie osseuse, clinique du vieillissement squelettique humain (ostéoporose) et évolution de la formation de l'os qui fait partie des bouleversements qui ont marqué l'homínisation. Il remplace un précédent modèle qui aboutissait à la mort périnatale des animaux homozygotes, et à la perte de fertilité des animaux hétérozygotes (REPLACEMENT).

Trois souches comportant 720 souris seront exploitées – soit un total, au maximum, de 2160 souris sur cinq ans.

Ces trois souches perdent, après induction, l'expression d'un couple de facteurs déterminants de l'homéostasie osseuse dans trois populations cellulaires différentes de l'os. Les autres tissus (gonades, etc.) ne sont pas concernés, contrairement au modèle précédent (RAFFINEMENT).

On pense que ces deux facteurs y coopèrent pour réguler le recrutement et l'activité des cellules engagées dans cet équilibre. Nos travaux antérieurs sur un seul des deux facteurs ont montré que la perte d'un allèle était suffisante pour provoquer une perte minérale osseuse dès l'embryogenèse. Mais on ne connaît pas leur activité postnatale. Pour examiner ces fonctions chez l'adulte, il faut donc les muter dans l'os juvénile, adulte ou âgé.

La double mutation est induite par injection intrapéritonéale de tamoxifen, qui active une recombinaison génomique spécifique.

Le squelette est alors examiné à différents temps (au maximum, trois par mois) selon une stratégie longitudinale, sur souris anesthésiée. Au lieu de créer des lots de souris à sacrifier à différents temps après l'induction de la mutation, cette approche permet donc de réduire drastiquement le nombre de spécimens exploités en les ré-examinant plusieurs fois au cours de leur vie (REDUCTION). L'ostéodensitométrie fournit, entre autres paramètres, morphométriques, la densité minérale osseuse ("DMO"). L'induction de l'ostéoporose est suffisante lors de la réduction de 50% de ce paramètre, point limite de l'expérimentation.

Cette méthode réduit l'expérimentation animale au strict minimum – tant en durée qu'en nombre de spécimens – tout en accroissant la robustesse de l'analyse statistique par la multiplicité des mesures et des variables recueillies.

Trois âges d'expérimentation sont concernés (juvéniles, adulte et âgé); les deux genres sont examinés.

Quatre groupes contrôles sont constitués pour valider l'induction, le genre, l'âge et le génotype. L'analyse porte sur 10 souris par condition, soit un maximum de 720 spécimens par souche.

Ce projet dérive d'un précédent, en passant de l'analyse craniofaciale à l'analyse des os chez les mutants.

L'examen squelettique d'un contingent réduit de souris issues de ce premier projet a démontré l'innocuité de la double mutation sur le bien-être et la fertilité, jusqu'à douze mois après l'induction de la mutation.

Le phénotype osseux obtenu n'est pas dommageable. Cette observation a permis de définir un point limite à l'expérimentation (réduction de 50% de la densité minérale osseuse): RAFFINEMENT.

La procédure d'induction de la mutation, comme la procédure de marquage au colorant vital puis la procédure de sédation légère pour immobiliser les souris pendant l'imagerie radiographique sont de CLASSE LEGERE puisque n'impliquant que des injections intrapéritonéales de solutions (respectivement tamoxifène, calcéine/tétracycline puis kétamine/xylazine) dont l'emploi est maîtrisé depuis 2006 au laboratoire. Une classe sans réveil clôture cette expérimentation pour tous les spécimens analysés, en vue de prélèvements tissulaires.

Le déroulement de l'ostéoporose pourrait être mieux compris grâce aux données collectées chronologiquement dans ce projet.

2706- Les pathologies infectieuses néonatales et infantiles sont un problème majeur en santé humaine et animale. Les infections intestinales causent notamment 1,7 milliard de cas de diarrhée chaque année dans le monde et sont la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans. Dans les pays en développement, les enfants de moins de trois ans souffrent en moyenne de trois épisodes diarrhéiques par an, ce qui favorise la malnutrition et a un impact important sur leur croissance. Les rotavirus et les *Escherichia coli* sont les causes principales de diarrhées infectieuses chez les jeunes mammifères et peuvent provoquer des maladies, des retards de croissance, des pertes économiques... Ils sont responsables de la majorité des décès par diarrhée, et représentent un coût considérable pour le système de santé dans les pays industrialisés. La lutte contre les infections, et en particulier les infections intestinales, représente donc un enjeu de santé publique et économique majeur et il existe encore aujourd'hui un grand besoin de développer de nouveaux traitements pour prévenir ou guérir ces infections.

Les mammifères naissent stériles mais aussitôt après leur naissance, leurs muqueuses sont colonisées par une variété de microorganismes et forment rapidement un microbiote très dense et diversifié. Une relation mutuellement bénéfique s'établit alors entre l'hôte et les microorganismes qui occupent son intestin. Cependant, la muqueuse intestinale constitue un environnement à l'équilibre fragile du fait qu'elle peut être envahie par des microorganismes pathogènes qui utilisent cette muqueuse comme une voie d'entrée dans l'organisme et provoquent ainsi des infections. C'est le rôle du système immunitaire que de mettre en place des réponses différenciées vis-à-vis des microorganismes commensaux (bénéfiques) et pathogènes. Le microbiote intestinal joue également un rôle majeur dans la défense contre les pathogènes en entrant en compétition avec eux et surtout en stimulant le développement et la maturation du système immunitaire.

Il a été récemment démontré que la bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron*, un membre dominant du microbiote intestinal humain, était capable de mûrir à lui seul le système immunitaire intestinal à un niveau proche de celui observé avec un microbiote intestinal complet.

Nous proposons de tester l'effet préventif de la maturation du système immunitaire par *B. thetaiotaomicron* dans plusieurs modèles animaux d'infection ayant une pertinence aussi bien chez l'homme que chez l'animal : rotavirus, *Citrobacter rodentium* (modèle murin d'*E. coli* entéro-pathogènes et entéro-hémorragiques) et virus grippal. Nous avons choisi d'évaluer l'effet de *B. thetaiotaomicron* dans un modèle d'infection extra-digestive (la grippe), car les recherches récentes montrent que le microbiote intestinal a des effets stimulants sur le système immunitaire au-delà de l'intestin. Ainsi, la stimulation de l'immunité par *B. thetaiotaomicron* pourrait avoir des effets sur des infections extra-digestives. Nous avons choisi d'évaluer l'effet dans l'infection grippale car elle représente une cause majeure de mortalité, de morbidité et de coût pour le système de santé et une charge importante pour l'élevage (principalement aviaire). Ainsi, les animaux recevront dès leur plus jeune âge la bactérie *Bacteroides thetaiotaomicron* par administration orale et seront ensuite infectés par l'un de ces trois agents pathogènes (administration par voie orale (gavage) ou intra-nasale sous anesthésie) afin de mesurer l'effet potentiellement bénéfique sur la sévérité des symptômes.

Dans une volonté de respecter la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser au maximum les expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Cependant, l'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal (en l'occurrence murin) pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à 8 animaux car travailler avec un effectif plus faible ne permettrait pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs étant donné la variabilité de ces expérimentations animales. Chacune des expérimentations est effectuée avec des doses adaptées et limites n'engendrant pas ou très peu de mortalité. Enfin, les conditions d'euthanasie sont clairement définies. Les animaux recevront un enrichissement constitué de cellulose en morceaux. Le projet se déroulera sur une période de 2 ans et nécessitera au total moins de 1000 animaux.

2707- Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement pour la polyarthrite rhumatoïde, la forme la plus fréquente des rhumatismes inflammatoires chroniques. Cette maladie des articulations évolue par poussées inflammatoires de durée et d'intensité variables pour gagner progressivement de nouvelles articulations. Elle provoque des gonflements et des douleurs notamment au niveau des mains, des poignets, des genoux et des petites articulations des pieds. Avec le temps, les épaules, les coudes, la nuque, les mâchoires, les hanches et les chevilles peuvent être touchés. Dans 20 à 30% des cas, l'inflammation provoque la dégradation progressive du cartilage et de l'os des articulations touchées, et entraîne leur déformation. En l'absence de traitement et sous ses formes les plus graves, la maladie peut être responsable de handicaps au bout d'une dizaine d'années et empêcher d'assurer les gestes quotidiens et une activité professionnelle.

La polyarthrite rhumatoïde touche 0.25% de la population générale, et les femmes trois fois plus souvent que les hommes. Bien que la maladie puisse apparaître à n'importe quel âge, les premiers symptômes surviennent en général entre 40 à 60 ans. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire s'attaque à la membrane synoviale des articulations. La membrane synoviale tapisse l'intérieur des articulations et fabrique un liquide, le liquide synovial, qui lubrifie l'articulation et la rend mobile. Quand cette membrane est agressée, elle s'épaissit et fabrique trop de liquide contenant des enzymes et médiateurs inflammatoires susceptibles d'agresser toute l'articulation, les cartilages, les tendons et l'os.

Il existe à l'heure actuelle deux types de traitements pour cette maladie, ceux destinés à soulager les douleurs lors des poussées inflammatoires (paracétamol, anti-inflammatoires non stéroïdiens, corticoïdes, dérivés morphiniques), et ceux qui permettent de contrôler l'inflammation et l'évolution de la maladie sur le long terme (Méthotrexate, Léflunomide, Hydroxychloroquine, Azathioprine, Sulfalazine). Depuis quelques années, de nouveaux traitements immunosuppresseurs ou biothérapies sont apparus sur le marché (anti-TNF, anti-IL6...). Ces médicaments injectables, très efficaces, ont un coût très élevé et présentent des effets secondaires sérieux comme la réduction des défenses immunitaires contre certaines infections. Malgré tout cet arsenal thérapeutique, 30% des patients ne répondent pas aux traitements. De plus, les malades rechutent rapidement dès l'interruption du traitement. Il est donc essentiel d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour permettre aux patients de rétablir de façon durable leur tolérance immunitaire.

Dans ce contexte, un modèle animal de polyarthrite rhumatoïde est nécessaire pour recréer les phases d'inflammation et de destruction du cartilage et de l'os, car les modèles cellulaires *in vitro* ne récapitulent pas tous les processus mis en place *in vivo* lors de l'atteinte de l'articulation, avec l'implication de différents types cellulaires au cours du temps.

Les composés chimiques ou biologiques évalués dans ce projet seront pré-sélectionnés *in vitro* sur des critères d'efficacité, et *in vivo* sur des paramètres pharmacocinétiques, afin de limiter le nombre de produits à tester dans le modèle animal de la pathologie. Ils seront testés en mode préventif pour mesurer leur capacité à empêcher l'apparition des symptômes, ou en mode thérapeutique pour déterminer leur efficacité sur la progression de la maladie et l'atteinte osseuse.

La polyarthrite rhumatoïde sera induite chez le rat ou la souris par deux injections intradermales de collagène de type II afin de déclencher une réaction auto-immune. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent environ deux semaines après l'immunisation, et se traduisent par une inflammation progressive au niveau des articulations des pattes. Dès l'apparition des premiers symptômes, la nourriture et l'eau sous forme gélifiée seront mises à disposition directement sur le fond de la cage afin de faciliter leur accès pour les animaux. Le poids des animaux sera suivi quotidiennement et le degré d'atteinte des articulations sera déterminé à l'aide d'une grille pré-établie de signes cliniques liés à la pathologie. Des prélèvements sanguins et une scanographie pourront être réalisés durant l'étude. Tous les moyens seront mis en œuvre pour réduire la souffrance des animaux. Deux types de matériel de nidification seront fournis en permanence aux animaux pour assurer leur bien être durant les études.

Il est prévu d'utiliser 200 animaux par an (100 rats et 100 souris), soit un total de 1000 animaux (500 rats et 500 souris) sur les 5 ans de ce projet.

2708- Dans le cadre des activités de recherche, pour découvrir ou développer de nouvelles solutions thérapeutiques, un certain nombre d'étapes nécessitent le recours à l'animal de laboratoire. La multiplication des protocoles *in vitro* permet de limiter le nombre d'études sur animaux, mais nécessite néanmoins de disposer de tissus et/ou organes.

Ce projet décrit le support zootechnique apporté aux projets de recherche, projets pour lesquels un certain nombre de procédures doit être mis en place :

- Prélèvements de liquides biologiques et tissus sur des gros animaux provenant d'autres projets (souci de réutilisation) pour constituer des banques mises à disposition des chercheurs pour développement ou validation de tests.
- Formation et maintien des compétences du personnel en contact avec les animaux de laboratoire pour garantir qu'il n'y aura pas d'interférence avec les résultats et les mesures prévues dans les procédures, en minimisant le stress subi par les animaux.

Ce projet comprend au maximum 240 souris, 240 rats, 90 hamsters, 120 chiens et 120 primates non-humains provenant, en priorité, d'autres projets (réutilisation). La commande exceptionnelle d'animaux pour ces procédures ne concernera que les rongeurs pour les études ou les formations à haute priorité ne permettant pas de s'aligner sur les disponibilités d'animaux de réutilisation.

Les procédures sont menées en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Nous veillons notamment à :

- utiliser un nombre minimum et suffisant d'animaux
- héberger tous les animaux dans un environnement enrichi
- anesthésier les animaux pour les interventions chirurgicales et certains gestes techniques lors des sessions de formations
- appliquer des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées.

2709- Au cours de l'évolution de l'Homme, certains changements morphologiques et fonctionnels ont eu lieu simultanément. En particulier, *Homo neanderthalensis* diffère d'*Homo sapiens* à la fois par la forme de son crâne, la morphologie de son cerveau et, vraisemblablement, ses facultés cognitives. Ces traits pourraient avoir évolué indépendamment, mais pourraient aussi avoir une origine génétique commune, liée à la mutation de gènes pléiotropes régulant simultanément ces différents caractères. Parmi ces gènes qui ont été proposés pour ces rôles, *Dlx5* et *Dlx6* sont de candidats de choix à la lumière de leurs multiples fonctions morphogénétiques. L'implication de *Dlx5/6* dans la morphogenèse cranio-faciale a été clairement montrée, mais les connaissances sur les rôles de *Dlx5* et *Dlx6* dans la cognition sont pour le moment parcellaires, faute de modèles exploitables. Il est cependant décrit que des anomalies de ces gènes sont à l'origine de défauts cognitifs tels que la

schizophrénie ou l'autisme. Au cours d'un projet précédent approuvé par le comité éthique, nous avons généré de nouveaux modèles provoquant une expression d'allèles modifiés ces gènes sélectivement dans le cerveau. Ces souris ont un comportement modifié, notamment une baisse importante de l'anxiété et une spontanéité et sociabilité accrues.

Les objectifs de ce projet sont :

- Approfondir la description du phénotype comportemental induit par l'expression des protéines Dlx5/6 modifiées
- Décrire les complexes protéiques auxquels participent Dlx5, Dlx6 par spectrométrie de masse
- Effectuer une analyse neuroanatomique du système nerveux central exprimant les protéines modifiées.

Ces expériences visent à comprendre le développement, la maturation et fonctionnement cérébral, qui sont des processus intégrés et complexes. Il est impossible de les modéliser ni de les simuler in vitro. L'utilisation d'animaux est indispensable pour aborder ces questions.

La majeure partie de ce projet consiste à soumettre les souris à des tests comportementaux simples, au cours desquels les souris réalisent des tâches naturelles pour elles, engendrant donc un stress minime. Ces tests consistent à explorer un nouvel environnement contenant ou non des objets ou d'autres souris pendant une dizaine de minutes avant de retourner dans leurs cages. Les animaux seront filmés au cours des tests pour permettre la quantification de leur comportement.

Le raffinement concernera les conditions d'hébergement, qui seront optimisées pour que les animaux soient sereins durant toute la durée de l'expérimentation.

Les études neuroanatomiques nécessitent le prélèvement post-mortem des cerveaux de certaines souris. Toutefois, dans le but de minimiser au maximum le nombre d'animaux sacrifiés et se conformer avec la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer), chaque prélèvement effectué sera scindé en plusieurs séries. Cela permettra de réaliser plusieurs observations différentes sur le même échantillon, et ainsi de réduire considérablement le nombre de prélèvements nécessaires. A terme, les résultats de l'étude des partenaires protéiques de Dlx5/6 par spectrométrie de masse devraient nous permettre de développer des tests en culture cellulaire pour poursuivre cette ligne de recherche, contribuant à diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les expériences futures.

Nous estimons à 60 le nombre de souris impliquées sur la durée totale du projet (2 ans).

2710- Les fonctions cognitives (vigilance, mémoires, fonctions exécutives, ...) peuvent être sévèrement affectées chez les malades atteints de troubles neuropsychiatriques (schizophrénie, déficit attentionnel et hyperactivité...) du fait de la maladie elle-même mais aussi du fait des médicaments pris pour la traiter. En effet, les médicaments qui doivent être pris sur le long terme, peuvent être à l'origine d'effets indésirables comme la somnolence ou la perte de mémoire, pouvant entraîner l'arrêt des traitements, d'où la nécessité de trouver d'autres médicaments n'induisant pas ou peu ces effets. Ces derniers peuvent être détectés chez le rongeur au moyen de tests comportementaux spécifiques.

L'observation d'un animal effectuant une tâche ludique (appuyer sur un levier, attendre un signal sonore ou lumineux, ...), de son attention, sa mémoire, sa vitesse de réaction ou son activité locomotrice, donne des informations essentielles sur les effets du produit étudié. Certaines informations sont obtenues grâce aux tests d'apprentissage nécessitant de garder les animaux préalablement conditionnés, plusieurs semaines voire plusieurs mois.

Cette meilleure connaissance des effets du médicament passe par l'utilisation de différents modèles expérimentaux chez les rongeurs. Aucune méthode alternative ne permet à ce jour de tester les fonctions cognitives ainsi que les effets pouvant les affecter. Pour les tests d'apprentissage, les rongeurs conditionnés sont conservés jusqu'au déclin de leur performance, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le raffinement des modèles s'effectue au travers des conditions d'hébergement qui sont améliorées par des dispositifs d'enrichissement (tunnel par exemple).

Le nombre d'animaux nécessaires est calculé en fonction de la variabilité observée de chaque mesure et de l'effet pharmacologique minimum attendu des produits testés. Un effectif maximum de 10 000 rats et 4000 souris sur 5 ans (soit 2000 rats et 800 souris par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme incluant plusieurs dizaines de molécules par an.

2711- Certaines études expérimentales chez le porc, comme l'étude de pathogènes spécifiques, le contrôle de vaccins ou la production de sérums ou d'organes doivent être réalisées sur des animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), afin que d'éventuelles autres contaminations ne viennent pas modifier les symptômes ou les réactions immunitaires des animaux. Ces porcs EOPS peuvent naître par voie naturelle d'une truie elle-même indemne de pathogènes spécifiés ou par césarienne. Cette césarienne doit être réalisée dans des conditions les plus aseptiques possibles. Les porcelets issus de cette opération sont ensuite transférés, également dans des conditions aseptiques, dans un élevage confiné dont tous les intrants sont contrôlés afin de réduire le risque de contamination externe : air filtré, alimentation thermisée (lait irradié aux rayons gamma, aliment chauffé à une température de 85°C afin de détruire certains germes potentiellement pathogènes), matériel désinfecté, douche pour le personnel, etc. L'asepsie lors de la césarienne est obtenue en réalisant la césarienne sur un utérus isolé par hystérectomie et ouvert dans un isolateur à atmosphère filtrée. L'objectif de ce projet est d'optimiser l'inconscience de la truie qui subit l'hystérectomie tout en préservant le réveil des porcelets. En effet, peu de données sont disponibles sur l'anesthésie de la truie pour la réalisation de césarienne tout en garantissant un bon réveil des porcelets. Pour cela plusieurs protocoles d'anesthésie seront expérimentés sur un maximum de six truies, deux non gestantes et quatre gestantes. Les truies seront surveillées à tout moment de l'opération puis euthanasiées, toujours inconscientes, juste après l'ablation de l'utérus. Les porcelets seront surveillés en continu. Leur élevage et leur utilisation pour d'autres projets feront l'objet d'autorisations indépendantes.

2712- L'influenza aviaire est une maladie virale hautement contagieuse qui touche plusieurs espèces de volailles utilisées pour la production alimentaire (poulets, dindes, cailles, pintades, etc.). Elle est réputée contagieuse et sa déclaration est donc obligatoire. Dans le cadre de mise au point de techniques immunologiques de détection et d'étude de protéines de virus Influenza aviaire, il est nécessaire d'obtenir des sérums spécifiques envers des protéines virales. Afin de récolter ces sérums spécifiques, plusieurs méthodes d'immunisation sur poulets seront mises en œuvre. Pour chaque combinaison d'immunisations, seuls 9 poulets seront utilisés (6 animaux afin de récolter uniquement le volume de sérum nécessaire et 3 poulets témoins). Le nombre de combinaisons d'immunisations sera fonction du matériel d'immunisation disponible (le nombre de souches virales disponibles) au moment de la procédure expérimentale. Le nombre total d'animaux sera au maximum de 234 (correspondant à 26 protocoles d'immunisation différents=>26 combinaisons d'immunisation X 9 animaux= 234). La seule solution pour produire un sérum est d'injecter une substance immunisante (antigène) à un animal doté d'un système immunitaire fonctionnel, de ce fait, le projet ne peut se faire sans recours à l'expérimentation animale. Même si aucun effet nocif n'est attendu (puisque à aucun moment du virus vivant ou entier ne sera inoculé), les animaux seront tout de même surveillés 1 fois par jour et l'expérimentateur sera attentif à toute anomalie éventuelle qui pourrait occasionner une baisse d'activité ou d'appétit des animaux, des signes d'inconfort ou d'autres signes cliniques. La procédure est conduite dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner). Notamment, afin de réduire au mieux les effectifs utilisés, les animaux considérés comme témoin de chaque groupe seront mutualisés autant que possible en conduisant en parallèle plusieurs protocoles d'immunisation.

2713- La recherche et le développement de nouveaux médicaments impliquent plusieurs étapes, depuis la découverte de molécules potentiellement thérapeutiques (« drug discovery ») jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament. La première étape consiste en une sélection (« screening ») de molécules d'intérêt, qui devront ensuite être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires puis nécessairement *in vivo* chez des animaux vivants avant d'être testées en clinique chez l'Homme. Les tests *in vivo* visent à caractériser les effets et le comportement de molécules candidates après administration chez l'animal. Il est notamment indispensable d'évaluer différents paramètres dont ceux d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) des molécules car ce sont des éléments cruciaux pour la sélection de candidats médicaments.

Ces analyses ont considérablement amélioré le taux de succès de la recherche et du développement de médicaments ces vingt dernières années pour trois raisons principales : (i) ces études ont été incorporées en routine dès les phases précoces de découverte de nouvelles molécules, (ii) les scientifiques ont une meilleure connaissance des enzymes et des transporteurs impliqués dans le métabolisme des médicaments ainsi que des différences entre les espèces et individus, (iii) des stratégies d'optimisation des propriétés métaboliques et pharmacocinétiques des molécules ont été établies et appliquées à la recherche et au développement de médicaments.

Il existe des modèles cellulaires permettant d'évaluer la cytotoxicité, l'absorption et le métabolisme de molécules *in vitro*. Ces tests permettent d'effectuer un premier criblage de molécules ; cependant, aucun modèle *in vitro* ne peut remplacer complètement un organisme vivant. Il est indispensable de mener ces études dans un modèle animal qui permet d'évaluer des paramètres essentiels comme la clairance, la biodisponibilité, l'exposition, la demi-vie et le volume de distribution d'une molécule suite à son administration chez l'animal. Ces analyses, qui aident à la détermination de la dose à administrer, doivent être réalisées avant de passer aux études de toxicologie et d'efficacité des molécules. L'ensemble de ces données aide à la prédiction du comportement d'un médicament lors d'une administration chez l'Homme.

La cannulation du canal biliaire chez le rat est un outil classiquement utilisé dans les expériences ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Élimination) pour estimer l'élimination biliaire d'un médicament.

Ce projet s'effectuera chez la souris, le rat et le lapin.

Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 120 souris, 120 rats et 120 lapins pour l'évaluation de l'excrétion biliaire de nouvelles molécules thérapeutiques.

La règle des 3Rs sera appliquée à ce projet selon les modalités suivantes :

- Remplacement des animaux d'expérience : l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé, le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour chaque groupe.
- Raffinement : Evaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, production biliaire), enrichissement du milieu dans les cages.

2714- Les circuits neuronaux impliquant des interactions mutuelles entre le cortex cérébral et les noyaux gris centraux, dont le thalamus, jouent un rôle majeur dans la cognition et le comportement. Ils sont affectés dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques. Notre recherche sur des modèles animaux est dédiée à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de troubles cognitifs similaires à ceux observés chez des patients atteints de maladies psychiatriques comme la schizophrénie. Notre but ultime est de développer une preuve de concept thérapeutique utilisant la modulation électrique de circuits neuronaux en vue de corriger de tel troubles. Plus précisément, nous mettons en œuvre, *in vivo* chez le rat, des explorations électrophysiologiques cellulaires et des modulations électriques au sein de circuits neuronaux intacts pour étudier, dans des conditions physiologiques et pathologiques, les mécanismes à l'origine des interactions cellulaires. Les explorations électrophysiologiques intracérébrales sont indolores. Elles ne sont pas remplaçables par des approches *in vitro*,

qui utilisent des systèmes neuronaux déafférentés, et par des outils mathématiques. Nous sommes donc engagés à 2 des 3 "R", "Réduire et Raffiner". A ce titre nous avons au fil du temps optimisé nos approches électrophysiologiques, nous permettant d'augmenter leur taux de succès (>80%) et donc de réduire significativement le nombre d'animaux requis pour nos études. Toutes les précautions sont prises pour respecter l'animal (bien-être physique et psychologique) et de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaires à la validation des résultats scientifiques. Durant les cinq prochaines années (mai 2016-avril 2021) nous utiliserons un total de 168 RATS Wistar (mâles et âgés de 13 à 25 semaines). Tous les animaux subissent sous anesthésie générale une chirurgie stéréotaxique pour l'implantation d'électrodes intracérébrales d'enregistrement et de stimulation électrique. Les enregistrements et stimulations sont effectués sur des animaux sédatisés ou vigiles. Ils reçoivent par voie sous-cutanée une injection subanesthésique de kétamine, un antagoniste de récepteurs au glutamate connu pour produire chez l'homme un état psychotique (hallucinations, troubles de la cognition et de la pensée). Deux conditions expérimentales sont utilisées pour étudier les effets de la kétamine et de la modulation électrique des circuits neuronaux: 1) La condition vigile chronique (2-3 mois) pour étudier les activités cérébrales spontanées en corrélation avec le comportement (56 rats). 2) La condition aigue pour étudier sur des rats sédatisés les activités cellulaires spontanées et évoquées par une activation sensorielle et/ou une stimulation électrique des circuits (112 rats). A la fin des expériences les animaux reçoivent une injection mortelle de doléthal.

2715- Chez la femme, les deux pathologies gynécologiques impliquant le muscle utérin sont la dysménorrhée et l'accouchement prématuré.

La dysménorrhée primaire (menstruations douloureuses) en l'absence de pathologies pelviennes affecte 45-98% des femmes. En dépit de cette forte prévalence, la dysménorrhée est peu traitée et est considérée comme normale, par les professionnels de la santé, mais également par les patientes. Cependant, ces douleurs menstruelles ont un impact négatif sur la qualité de vie. D'après l'OMS, chaque année, quelque 15 millions de bébés naissent prématurément (avant 37 semaines révolues de gestation). Ce nombre est en constante augmentation. A l'origine de près d'un million de décès par an en 2013, les complications des naissances prématurées sont la cause principale de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. Sur 184 pays, le taux des naissances prématurées varie entre 5% et 18 % des bébés nés.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle permettant d'enregistrer les contractions utérines chez le rat anesthésié afin de tester des candidats médicaments pouvant inhiber ces contractions apparaissant lors des cycles menstruels ou lors d'accouchements prématurés. Actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant d'étudier la dysménorrhée et l'accouchement prématuré dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter ces pathologies.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 120 rats en raison 10 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 8 animaux inclus), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant dans la mesure du possible, de mesurer la valeur basale de chaque animal (l'animal est son propre contrôle).

Notre stratégie permet donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement). Dans le cas de prétraitements, un nombre minimum d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R.

2716- Les personnes prises en charges à l'hôpital suite à une blessure de la colonne vertébrale (= traumatisme médullaire), par exemple suite à un accident de la route, développent très fréquemment des pneumonies (infections pulmonaires) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire). Il est connu que le système nerveux module et influence les capacités de défense de l'organisme mais le(s) mécanisme(s) est (sont) inconnu(s). Les cellules NK (Natural Killer) sont des cellules de l'immunité ayant un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire. Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les cellules NK ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire). Suite à un traumatisme médullaire, la perte des signaux nerveux à la rate (lieux de concentration des cellules NK) est suspectée d'induire une modification de l'activité des cellules NK vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation à réagir contre une infection bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection. Le but de notre étude est de vérifier si la création de lésions médullaires (retrouvés chez les traumatisés) conduit à l'apparition d'une activité anti-inflammatoire des cellules NK de la rate (1ère partie) expliquant l'augmentation de susceptibilité des patients aux infections nosocomiales (2ème partie). Pour cela, 369 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se divise en 2 parties. La 1ère partie consistera à évaluer le rôle des cellules NK dans la mise en place d'une inhibition du système immunitaire suite à un traumatisme de la colonne vertébrale. La 2ème partie évaluera le rôle des cellules NK suite à une infection pulmonaire à *Staphylococcus aureus* (doré (Staphylococcus aureus)). Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec un remplacement journalier de la litière.

2717- La toxoplasmose est une parasitose dont la prévalence chez l'Homme, en France, est d'environ 40% dans la population générale. Il s'agit dans plus de 80% des cas d'une infection asymptomatique et bénigne. Plus rarement, cette

infection peut revêtir un caractère de gravité. Ainsi, chez la femme enceinte, contexte dans lequel s'effectue ce projet, l'infection par *Toxoplasma gondii* peut être responsable d'une toxoplasmose congénitale par atteinte du fœtus (transmission transplacentaire). En cas de séroconversion en cours de grossesse, si la mère n'est pas traitée, le risque de transmission verticale est d'environ 15% au premier trimestre, 30% au second et 60% au troisième trimestre. La gravité de celle-ci est d'autant plus importante que l'infection survient précocement au cours de la grossesse. Ainsi, La toxoplasmose congénitale peut être responsable d'avortement, d'encéphalo-méningo-myélite, de retard psychomoteur etc..., lors d'une contamination de début de grossesse. A noter, que 80% des toxoplasmoses congénitales en France sont asymptomatiques à la naissance, les complications pouvant être tardives (forme oculaire ou neurologique retardée) d'où l'importance d'un dépistage précoce afin de mettre en place un traitement adapté. En France, on estime entre 2500 et 4000 le nombre de séroconversions durant la grossesse chaque année. Environ 300 toxoplasmoses congénitales sont notifiées chaque année au Centre National de Référence de la Toxoplasmose (3 à 4 cas pour 10.000 grossesses).

En France, le dépistage sérologique mensuel (recherche d'anticorps dans le sang) de la toxoplasmose durant toute la durée de la grossesse chez les femmes enceintes séronégatives pour la toxoplasmose, constitue une obligation légale depuis 1978, (art. R. 2122-1 du CSP). En cas d'infection maternelle avérée en cours de grossesse, un diagnostic précoce prénatal (activité réservée aux centres agréés) réalisé sur le liquide amniotique recueilli lors d'une amniocentèse doit être proposé. En cas de positivité, il permet la mise en place précoce d'un traitement adapté et limite les complications pour le fœtus. En complément, un diagnostic néo-natal est également réalisé pour tous les nouveau-nés si le diagnostic anténatal est négatif ou non réalisé. Le diagnostic de toxoplasmose congénitale réalisé à la naissance, repose sur la sérologie et l'analyse du placenta et du sang de cordon/sang de bébé. En revanche, un résultat négatif n'exclut pas l'atteinte fœtale, les données bibliographiques faisant état d'environ 35% de faux négatifs.

Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale reste limité aux laboratoires spécialisés. Il nécessite dans le cas particulier du diagnostic prénatal (DPN), un agrément délivré par l'Agence de la Biomédecine. Seule l'identification formelle du parasite dans ces liquides biologiques, par biologie moléculaire (détection de l'ADN du parasite par PCR) et/ou par inoculation à la souris permettra de confirmer le diagnostic de toxoplasmose congénitale. Cette dernière constitue la méthode de référence, permettant également l'isolement de la souche du parasite, indispensable pour les études épidémiologiques. S'agissant d'un diagnostic difficile, la combinaison de l'inoculation à l'animal à la biologie moléculaire permet d'augmenter significativement la sensibilité du diagnostic. Le modèle murin, sensible à l'infection par le toxoplasme (parasite des animaux à sang chaud) est donc approprié et le seul disponible. L'expérimentation repose sur l'inoculation par voie intrapéritonéale à la souris, d'échantillons biologiques d'origine humaine issus de patients à risque de toxoplasmose congénitale (liquide amniotique, placenta ou sang de cordon/bébé). Exceptionnellement, d'autres échantillons peuvent être inoculés après décision du biologiste (LCR voir organes prélevés post-mortem). Le nombre de souris utilisées pour l'expérimentation est de 2 à 6 souris (lié à la nature et à la quantité d'échantillon biologique disponible). Une fois inoculées, les souris sont surveillées quotidiennement. L'infection par le toxoplasme, bénigne pour l'animal, sera affirmée par l'apparition d'anticorps spécifiques anti-Toxoplasmes, détectés sur une goutte de sang prélevée au niveau de la veine de la queue, un mois après inoculation. Dans de rares cas, l'infection peut être suspectée sur des signes d'infection précoce (poils hérissés, gonflement de l'abdomen). Le diagnostic est alors affirmé sur la présence de toxoplasmes, visible à l'examen au microscope du liquide d'ascite.

Tous les animaux (positifs ou négatifs pour la toxoplasmose) issus de l'expérimentation, font l'objet d'une euthanasie par inoculation intrapéritonéale d'un médicament ad hoc. Dans le cadre de la participation de notre laboratoire, référent sur le plan régional, au réseau national de surveillance de la toxoplasmose en France, toutes les animaux positifs font l'objet d'une dissection en vue de prélever les kystes intracérébraux qui seront adressés au Centre National de Référence de la Toxoplasmose (Limoges, France) en vue d'études épidémiologiques ultérieures.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est d'environ 1000 souris par ans en fonction du nombre de prélèvements à analyser.

En fonction de l'échantillon humain prélevé, le nombre de souris est réduit au maximum. Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées en parallèle par les tests sur liquide amniotique ce qui permet de remplacer quelques souris par des techniques in vivo. Enfin les souris sont surveillées quotidiennement et sont hébergées dans des cages de dimensions adaptées avec un enrichissement adéquate.

2718- Il y a 40 ans, le mot "stress" commençait à peine à être connu. Maintenant, c'est une réalité que plusieurs considèrent comme un problème normal de la vie moderne. Le stress est le lot quotidien d'une majorité de personnes dans leur travail, mais il atteint également les enfants, les adolescents et les personnes âgées. Selon l'American Institute of Stress, ce problème est à l'origine de 75 à 90% des nouvelles consultations médicales et de 60 à 80% des accidents de travail. Les coûts du stress se manifestent sous forme d'absentéisme, de perte de productivité, de rotation de personnel, d'accidents, de frais médicaux et légaux directs ainsi que d'assurances et de compensations. Cette situation s'aggrave d'année en année.

Dans le cas de stress aigu, les traitements médicamenteux permettent de reprendre le contrôle de la situation. Dans le cas de stress chronique, différents traitements médicamenteux peuvent être prescrits (bêta-bloquants, anxiolytiques, anti-dépresseurs, neuroleptiques) mais l'indication des ces traitements n'est pas toujours prioritairement l'effet anti-stress et ils ne sont pas dénués d'effets secondaires. En effet, le sevrage des traitements médicamenteux est très complexe et un arrêt brutal du traitement peut s'avérer dangereux. Le sevrage s'effectue sur une longue période avec une diminution de la dose très progressive. Ainsi, il est indispensable de privilégier des traitements anti-stress à court terme.

Le modèle rat est utilisé régulièrement par l'industrie pharmaceutique pour évaluer l'efficacité de produit contre le stress et le test utilisé est validé et reconnu par la communauté scientifique travaillant sur les tests comportementaux.

Le protocole consiste, après administration orale du produit à tester, en la mise en présence de l'animal d'une sonde électrique lui administrant une unique et très faible décharge électrique de 2mA sur les pattes antérieures. Ensuite, le comportement de l'animal est observé pendant 5 minutes. Un rat stressé va naturellement enfouir la source de stress (la sonde) en la recouvrant de sciure. Un rat non stressé ne portera pas d'attention particulière à la sonde, il retournera volontiers dessus.

Dans ce projet, 2720 rats seront utilisés en 40 études sur 5 années pour valider l'efficacité de 160 lots de production d'un produit anti-stress commercialisé pour l'homme et les animaux de compagnie. L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets de ces lots de production sur le stress car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Le nombre d'animaux est cependant limité au strict minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats, 4 produits étant testés simultanément pour limiter le nombre de groupes contrôle et référence (réduction). Chaque groupe comprend 10 animaux et 8 rats supplémentaires sont commandés pour palier les problèmes de rats ne touchant pas l'électrode et étant donc exclus de l'étude. Deux animaux supplémentaires par groupe seraient trop et l'expérience a montré que 8 rats supplémentaires pour 6 groupes d'animaux étaient nécessaires et suffisants. Les expérimentations sont effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur afin de limiter au maximum l'impact de l'administration orale et du test comportemental sur l'état de stress des animaux (raffinement).

2719- La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants par bourgeonnement (ou angiogenèse), permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

L'enrichissement du milieu est un facteur de bien-être pour les animaux en expérimentation qui sont amenés à rester un temps plus ou moins prolongé dans leur cage d'habitation. Il est nécessaire de mettre en place de l'enrichissement mais il ne faut pas que celui-ci modifie les résultats des études car un certain nombre de paramètres peuvent être modifiés par l'enrichissement comme : le poids (légère baisse due à une augmentation d'activité), les comportements alimentaire et hydrique, l'activité générale des animaux (plus importante, moins de repos), la température corporelle, les paramètres biologiques (corticostérone, interleukines...), la production de lait, la reproduction, les fonctions cognitives et le métabolisme cérébral, et le temps de cicatrisation. L'objectif de notre projet est d'étudier les effets de différents enrichissements sur la cicatrisation d'une plaie cutanée chronique induite chez le rat afin de déterminer quel(s) enrichissement(s) du milieu pourrai(en)t être utilisé(s) dans de futurs projets sur le modèle de cicatrisation utilisé comme requis par la Directive Européenne de 2010 sans modifier significativement la vitesse de cicatrisation de cette plaie.

Dans ce projet, 32 rats issus d'une précédente étude et ayant subi une procédure de classe modérée au maximum seront utilisés, répartis en 4 groupes de 8 animaux comme suit : - Groupe 1 : Plaie cutanée - Sans enrichissement - Groupe 2 : Plaie cutanée - Enrichissement 1 = enviro-dri - Groupe 3 : Plaie cutanée - Enrichissement 2 = brique de bois - Groupe 4 : Plaie cutanée - Enrichissement 3 = tunnel

Une plaie cutanée de 2,8 cm de diamètre sera induite sur le dos de chaque rat placé sous anesthésie gazeuse par retrait de la peau. Après la chirurgie les animaux recevront une injection sous-cutanée de buprénorphine pour supprimer toute douleur éventuelle liée à l'induction de la plaie. La plaie cutanée sera recouverte d'une compresse stérile maintenue en place par un sparadrap avec un changement effectué 3 fois par semaine, sans anesthésie. Les animaux seront placés en cage individuelle de 1300 cm² de surface, 18 cm de hauteur, pour éviter qu'ils ne s'arrachent la compresse et le sparadrap mis en place sur la plaie. Nous avons déjà réalisé de nombreuses études sur ce modèle de plaie chronique à la demande de plusieurs clients car il mime la pathologie humaine concernant notamment les escarres. Nous avons donc une très bonne connaissance de celui-ci et nous savons qu'il n'induit pas de douleur malgré la taille de la plaie induite (observations comportementales effectuées au cours des différentes études réalisées). Nous privilégions l'utilisation d'un pansement sec qui n'est pas gênant pour l'animal et qui n'induit aucune infection et aucune douleur au retrait car cela correspond au groupe d'animaux contrôle utilisé au cours de nos études. Nous avons également choisi cette plaie chronique car pour estimer l'influence de l'enrichissement sur la vitesse de cicatrisation, il faut une plaie qui ne cicatrise pas trop rapidement. L'évolution de la taille de la plaie cutanée induite, le temps nécessaire à sa cicatrisation, ainsi que le poids et les prises alimentaire et hydrique des animaux seront relevés régulièrement pendant toute la durée de l'expérimentation afin de recueillir un maximum d'informations. Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques par injection intrapéritonéale d'une surdose de pentobarbital. L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets sur la cicatrisation de nouveaux produits ou pansements car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer l'effet de différents enrichissements dans le modèle, ce qui permettra à l'avenir de choisir un enrichissement et de l'inclure dans toute nouvelle étude sur la cicatrisation. Ainsi des résultats optimum seront obtenus en tenant compte du bien-être des animaux

(raffinement). Cela permettra également d'utiliser le nombre minimum d'animaux (réduction) dans les meilleures conditions pour permettre l'exploitation des résultats.

2720- L'anxiété est un trouble du comportement fréquent chez le chat vivant en milieu clos (chat d'appartement) puisque 54% de ces animaux de compagnie présentent un comportement de type anxieux. Chez le chien, l'anxiété de séparation est également fréquente lorsque les animaux restent seuls la journée en absence de leurs maîtres. Les animaux de compagnie peuvent être traités avec des molécules anxiolytiques pour réduire les symptômes. Toutefois, ces médications présentent des problèmes de dépendance, de tolérance et de sevrage. De plus, ces molécules induisent une désinhibition comportementale associée à des comportements agressifs.

La recherche de nouveaux traitements anxiolytiques présentant moins d'effets secondaires est donc nécessaire. C'est dans ce cadre que se situe ce travail.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les propriétés anxiolytiques d'une nouvelle préparation alimentaire, contenant un ingrédient actif, chez le rat utilisé comme modèle du chat et du chien. Pour cela, 96 rats mâles Wistar d'un poids de 225-250 g seront évalués sur le plan comportemental suite à la consommation de l'ingrédient actif seul et de différentes préparations qui le contiendront. Les préparations ont été créées pour être appétentes de manière à faciliter la prise de l'ingrédient actif par les animaux.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de technique *in vitro* permettant d'évaluer les effets antistress d'un traitement. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une interprétation scientifique des résultats. Le test utilisé étant stressant et anxiogène pour les animaux, sa durée sera limitée au minimum nécessaire en accord avec les pratiques décrites dans la littérature scientifique.

Le modèle rat est utilisé régulièrement par l'industrie vétérinaire pour évaluer l'efficacité de produits actifs, et le test utilisé est validé et reconnu par la communauté scientifique travaillant sur les tests comportementaux.

Le protocole consiste, après consommation des produits à tester, en la mise en présence de l'animal d'une sonde électrique lui administrant une unique et très faible décharge électrique de 2 mA sur les pattes antérieures. Ensuite, le comportement de l'animal est observé pendant 5 minutes. Un rat stressé va naturellement enfouir la source de stress (la sonde) en la recouvrant de sciure. Un rat non stressé ne portera pas d'attention particulière à la sonde, il retournera volontiers dessus.

96 rats mâles Wistar d'un poids compris entre 225 et 250 g seront utilisés et répartis en 7 groupes de 6 à 15 rats chacun. Les produits testés seront Véhicule par gavage (n = 12), Diazépam par gavage (référence pharmacologique ; n = 6), préparation alimentaire (PA) par gavage (n = 12), consommation spontanée de PA contrôle puis gavage avec le véhicule (n = 15), consommation spontanée de PA contrôle puis gavage avec le Produit X (n = 15), consommation spontanée de PA sous forme sèche contenant le Produit X puis gavage avec le Véhicule (n = 15) et consommation spontanée de PA sous forme hydratée contenant le Produit X puis gavage avec le Produit Véhicule (n = 15).

Le groupe Diazépam (anxiolytique de référence) ne contient que 6 rats car il servira à valider le fonctionnement du test, mais ne sera pas inclus dans l'analyse statistique.

Les groupes Véhicule et Produit X par gavage permettront d'évaluer l'efficacité de l'ingrédient actif seul. Ils seront constitués chacun de 12 rats, effectif minimum pour la réalisation du test d'EDC avec 6 groupes d'animaux.

Les 4 autres groupes, qui nécessitent un entraînement à la consommation de PA, seront constitués de 15 rats pour s'assurer qu'au moins 12 rats de chacun de ces groupes consommeront les PA dans les conditions requises le jour du test.

Un total de 6 rats supplémentaires sera commandé pour remplacer les animaux qui ne toucheraient pas l'électrode dans les groupes Véhicule, Produits et Diazépam par gavage.

Après une période d'entraînement à la consommation spontanée et rapide des PA, chaque rat sera mis en présence du PA et/ou recevra un traitement par gavage en fonction de son groupe expérimental. Les animaux seront ensuite testés dans l'enfouissement défensif conditionné (EDC). Une observation quotidienne des animaux sera effectuée avec le contrôle de l'absence de signes de douleur comme les vocalises, de stress et d'anxiété comme l'isolement et l'agressivité.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets de ces produits sur le stress car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) (remplacement). Le nombre d'animaux est cependant limité au strict minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction). Les expérimentations sont effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur afin de limiter au maximum l'impact de l'administration orale et du test comportemental sur l'état de stress des animaux (raffinement).

2721- La résistance génétique aux maladies à prion (tremblante) chez le mouton est très largement documentée par l'étude de la maladie naturelle d'une part et des études expérimentales réalisées chez le mouton d'autre part. Elle est liée à la séquence du gène codant pour la protéine prion du mouton. Notre projet concerne l'établissement d'un modèle chez la souris dont le statut génétique mimera celui des moutons génétiquement résistants, tels qu'ils sont actuellement sélectionnés en élevage pour tenter d'enrayer la propagation de ces maladies, contagieuses dans cette espèce. La stratégie de ce projet repose sur le croisement de deux lignées de souris génétiquement modifiées, l'une exprimant une protéine prion « sensible » et l'autre une protéine prion « résistante ». La résistance génétique et les caractéristiques de la maladie éventuellement observée seront alors étudiées par des expériences qui reposeront sur l'inoculation intra-cérébrale de ces souris hybrides par des extraits cérébraux provenant de souris « sensibles » au stade clinique de la maladie. Les expériences portent sur 4 souches différentes de prion, inoculées pour 2 « passages » successifs aux 3 lignées (hybride, sensible et résistante) avec 12 souris par lot, soit un total de 288 souris sur 5 ans. Les souris font l'objet d'un suivi individuel (manipulation et observation à des

réponses réflexes). Ce suivi permet de mettre en évidence, les signes cliniques pouvant évoquer la mise en place de processus neurodégénératifs propres à ce modèle. A l'issue de la mise à mort des animaux malades identifiés par les signes cliniques caractéristiques des maladies à prion, des prélèvements (cerveau et rate) sont réalisés et permettent l'étude détaillée de la maladie à prion et de l'agent infectieux responsable. Ces modèles animaux transgéniques constituent un modèle de choix qui permettront de comprendre les possibilités et les mécanismes d'adaptation des prions à des hôtes à résistance génétique accrue. En l'état actuel des connaissances, ces modèles ne peuvent être remplacés par des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

2722- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

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

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

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. Un observateur déclenche manuellement le choc électrique afin de s'assurer que seules les pattes de l'animal sont en contact avec l'électrode (une webcam étant placée juste devant l'électrode). Ainsi l'administration du choc dans des parties sensibles telles que la langue, le museau ou les testicules est évitée. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, l'intensité du choc, le type de sciure, le protocole d'habituation,...L'origine des rats (éleveur) et les conditions d'élevage et de stabulation peuvent également avoir un effet sur le comportement des rats, notamment l'enrichissement utilisé ou non. La maîtrise de ses facteurs est déterminante pour la qualité des études réalisées. Les effets de nouveaux traitements potentiellement peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

Les fournisseurs et les laboratoires modifiant régulièrement les conditions d'élevage des rats pour des raisons de réglementation, d'amélioration de la qualité ou par souci éthique, une dérive progressive dans le comportement des rats dans le test de l'EDC a été observée. Une première étude a permis d'étudier la réponse comportementale des animaux de même souche, fournis par 2 éleveurs, suite à des chocs d'intensités variables. L'objectif de ce deuxième projet est maintenant de comparer, pour l'intensité de choc la plus faible induisant un enfouissement défensif, la sensibilité des rats provenant des mêmes élevages après traitement avec des produits anxiolytiques de référence, pour déterminer les conditions optimales d'utilisation du test.

Dans ce projet, 72 rats seront utilisés, en 2 lots de 36 animaux provenant chacun d'un éleveur différent. Chaque lot sera réparti en 3 groupes de 12 rats traités comme suit :

- Groupe 1 : Rats Éleveur 1, véhicule
- Groupe 2 : Rats Éleveur 1, diazépam
- Groupe 3 : Rats Éleveur 1, référence interne
- Groupe 4 : Rats Éleveur 2, véhicule
- Groupe 5 : Rats Éleveur 2, diazépam
- Groupe 6 : Rats Éleveur 2, référence interne

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la sensibilité du test en fonction de l'éleveur et du traitement, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats.

2723- L'obésité est la première épidémie non infectieuse planétaire, touchant une part croissante de la population de tous les pays (1/10 de la population mondiale est obèse en 2015 d'après l'OMS et évoluera à 1/2 en 2030). L'obésité est fortement liée à de nombreuses maladies telles que l'hypertension artérielle, cardiopathie ischémique, et diabète de type 2, ce qui entraîne dans la majorité des cas une mortalité précoce. Les traitements actuels sont soit une prise en charge nutritionnelle, médicamenteuse et psychologique avec la reprise d'une activité physique, qui présente une faible efficacité, ou une approche chirurgicale. La chirurgie est le seul traitement ayant montré qu'il entraîne une perte de poids prolongée et stable. Il existe plusieurs techniques chirurgicales lourdes et contraignantes, dont certaines sont irréversibles. Elles engendrent une

diminution majeure de la qualité de vie : Incommodités permanentes tels que nausée, vomissements et douleurs abdominales, contrainte alimentaire à vie, dépression, anxiété, regret.

Le but de ce projet est de mettre au point un dispositif médical, mis en place par endoscopie qui permettrait de réduire l'absorption des nutriments par le système digestif, et ainsi entraîner une perte de poids tout en évitant une intervention chirurgicale risquée et irréversible. A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'évaluer *in vitro* l'innocuité et l'efficacité d'un dispositif médical sur la perte de poids. C'est pourquoi nous devons faire appel à un modèle animal. Le Chien a été choisi car il possède un système digestif comparable à celui de l'être humain dans sa conformation. En outre ces animaux sont facilement sujets au surpoids.

Ces études vont nécessiter 20 animaux, ce qui équivaut au nombre minimum d'animaux indispensables pour obtenir des résultats significatifs. Les chiens seront maintenus dans un environnement médical adapté. De plus une équipe spécialement formée prodiguera des soins aux animaux et leur fournira un environnement social adapté. L'amaigrissement induit par le dispositif sera suivi très régulièrement et stoppé rapidement dès que la preuve de concept sera obtenue. Tous les désagréments digestifs induits seront traités voire prévenus par un traitement médical systématique.

2724- En France, on estime à près de 3 millions le nombre de patients atteints de maladies rénales chroniques. L'évolution de nos sociétés et de nos modes de vie, l'augmentation de l'incidence de l'obésité, des maladies cardiovasculaires, du diabète ainsi que du vieillissement de la population font accroître de manière exponentielle le nombre de patients dans le monde atteint d'insuffisance rénale.

Les causes primitives des atteintes rénales sont multiples mais la majorité des néphropathies évolue vers le développement d'une fibrose rénale. Lutter contre le développement de la fibrose rénale représente donc un enjeu majeur. Il est donc important de développer de nouvelles solutions thérapeutiques et également de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces pathologies afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce projet va donc consister à évaluer l'efficacité de traitements anti-fibrotiques sur un modèle de fibrose rénale mis en place chez la souris et le rat.

Ce modèle (UUO model - Unilateral Ureteral Obstruction model) est largement décrit dans la littérature, il consiste en l'obstruction d'un uretère qui empêche ainsi l'écoulement de l'urine entraînant une élévation de la pression, qui génère un stress important et donc une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC) menant à l'apparition d'une fibrose. Ce modèle permet de mimer en accéléré le développement d'une fibrose tubulo-interstitielle: inflammation, prolifération des fibroblastes, apparition des myofibroblastes et accumulation de matrice extracellulaire.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable une fibrose rénale permettant d'évaluer l'efficacité de traitements anti-fibrotiques.

Le modèle de fibrose rénale va être mis en place sur deux espèces (souris et rats) car ce sont des modèles standards polyvalents et que leur utilisation pour ce modèle (UUO model) est largement décrite dans la littérature.

Lors de la réalisation de ce modèle, des méthodes d'anesthésie et d'analgésie seront mises en place. Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate.

Deux phases sont prévues dans ce projet. Tout d'abord, la réalisation et la validation de la mise en place du modèle de fibrose rénale chez la souris et le rat puis dans un second temps l'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-fibrotiques. Pour la première étape, 18 souris et 18 rats seront nécessaires pour mettre en place le modèle de fibrose. Pour la seconde étape, un maximum de 500 souris ou 500 rats seront nécessaires pour évaluer les différents traitements.

Le recours à l'imagerie médicale (scanner à rayon X) permettra de fournir des informations sur la structure et la fonction rénale de chaque animal au cours du temps (jusqu'à 21 jours après la mise en place du modèle c'est à dire la ligature d'un des deux uretères). Ainsi le recours à cette méthode permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires car tous les animaux seront conservés tout au long de l'étude. De plus, c'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen.

2725- Les pathologies de la peau de type inflammatoires autoimmunes regroupent différentes formes, d'étiologies diverses, encore incomplètement comprises. Parmi les pathologies inflammatoires chroniques, malgré les traitements actuels, il réside un besoin médical insatisfait pour le psoriasis. Ainsi la perte de réponse aux traitements tels que les molécules bloquant le TNF α ou les conséquences parfois sévères des traitements tels que les corticostéroïdes et immunosuppresseurs sont souvent observés chez les patients atteints d'inflammation chronique de la peau. Pour mettre en évidence *in vivo* l'efficacité de nouvelles thérapies, il convient tout d'abord d'identifier un modèle chez l'animal, regroupant les caractéristiques au moins histopathologiques permettant de confirmer l'efficacité de ces thérapies préalablement identifiées *in vitro*. Ce modèle de pathologie doit également limiter le nombre d'animaux développant des signes cliniques proches de ceux observés chez l'Homme mais dont la sévérité est limitée, assurant un maintien du respect du Bien-être animal. Nous avons identifié deux approches de thérapie cellulaire, basées sur l'utilisation de cellules T régulatrices (Treg). La première est basée sur l'isolation et l'amplification *in vitro* de cellules T CD4 $^{+}$ exprimant un récepteur des cellules T (TCR) spécifique pour un antigène exprimé au niveau de la peau (Ag-Treg). La deuxième est basée sur l'utilisation de cellules T régulatrices modifiées par génie génétique pour exprimer une molécule chimérique (CAR-Treg) permettant leur activation locale au niveau de la peau. Pour ces deux approches, nous validerons d'abord *in vitro* les produits les plus prometteurs pour être testés chez la souris sur un nombre limité d'animaux. Les molécules ciblées sont identiques entre l'Homme et la souris. Le modèle sélectionné est le modèle

d'inflammation induit par un composé qui est actuellement utilisé en clinique lors de protocole de vaccination. Les critères d'inflammation (rougeur, légère desquamation, épaissement de la peau) récapitulent le score clinique, utilisé chez les patients psoriatiques (score PASI donnant un Index de Sévérité de l'étendue du Psoriasis). De même, les caractéristiques histologiques confirment la pertinence de ce modèle d'inflammation cutanée. Pour cette première phase de projet de développement clinique, il convient d'utiliser un modèle animal robuste, rapide et assurant un niveau d'inflammation significatif mais léger. Ce projet vise donc à générer un modèle d'inflammation de la peau sur des souris adultes par application d'une crème. Ce modèle permettra d'obtenir les données nécessaires à la soumission d'essais thérapeutiques par injection intraveineuse de cellules immunitaires autologues modifiées. L'ensemble du projet de développement préclinique des cellules CAR-Treg et Ag-Treg compte un total maximal de 3925 souris. Nous réduisons au maximum le nombre d'animaux utilisés et ne développerons uniquement que les cellules Treg les plus prometteuses sur la base de tests in vitro. D'autre part, nous raffinerons les conditions d'hébergement pour limiter au maximum l'impact sur le bien-être animal.

2726- Notre laboratoire est leader dans le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux afin de comprendre comment ils agissent et quelle efficacité ils ont sur les cancers colorectaux. Les patients atteints de cancers colorectaux sont généralement traités par chimiothérapie, utilisant le 5-FU comme principal agent anti-cancéreux. Malheureusement une certaine proportion de patients peut acquérir une résistance à ce médicament. Il est donc nécessaire de trouver une autre approche thérapeutique pour ces personnes.

Au laboratoire, nous avons choisi un modèle cellulaire de cancers colorectaux provenant de patients atteints de cancer de type mucineux.

Ce modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, c'est souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants, les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés, le remplacement est facile à mettre en place, car ces études déjà faites in vitro doivent également être étudiées in vivo, l'environnement d'une tumeur est ici pris en compte. Ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire.

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 45 souris réparties comme suit :

- 15 souris contrôle
- 15 souris Aflibercept précoce
- 15 souris Aflibercept tardif

Ce projet fait suite à l'étude pilote.

Type d'animaux : souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 45 souris expérimentales pour une durée maximale de 1 an. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Une étude pilote a déjà été effectuée afin de déterminer le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo.

2727- Le projet a pour objectif l'évaluation de l'activité de différents produits immunologiques destinés à la prévention de différentes pathologies des carnivores domestiques. Cette évaluation sera conduite par le développement de modèles sur rongeurs. L'activité des produits sera évaluée au travers de la mesure de la réponse induite chez l'animal par l'analyse du taux d'anticorps sérique (test sérologique).

Ce projet comporte une procédure répétitive avec plusieurs finalités :

- essais de définition d'un protocole de remplacement d'un test d'activité légal par un test non légal.
- essais dans le cadre de Recherche et Développement destinés à l'amélioration d'un produit

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

- le remplacement d'un essai légal par un essai non légal destiné à être utilisé en contrôle de routine,
- Le développement d'un test sur rongeurs pour limiter l'utilisation de l'espèce cible, c'est-à-dire le carnivore domestique
- Lorsque cela est possible, l'utilisation d'animaux témoins communs au test d'activité de plusieurs lots, de manière à réduire le nombre global d'animaux utilisés,
- La définition de points limites adaptés,
- L'enrichissement apporté dans les cages des animaux.

Le nombre d'animaux envisagé sera de 5000 rongeurs pour l'ensemble du projet.

2728- La construction collective du tumulus constitue un trait majeur de l'histoire naturelle de la souris glaneuse, *Mus spicilegus*. L'édifice est impressionnant par sa taille et peut atteindre près de 2m de diamètre pour 60 cm de haut. Il est l'œuvre d'un groupe de souris juvéniles (5 à 25) et la construction comprend un certain nombre d'étapes successives : nettoyage du site d'édification; collecte de matériel végétal; recouvrement du tumulus par une couche de terre par projection puis par apport de tuiles de terre prélevées autour du tumulus et charriées jusqu'au sommet de l'édifice. En parallèle avec cette phase de recouvrement les souris vont commencer à édifier un réseau de galeries sous le. Ce tumulus a pour but essentiel de protéger les individus des intempéries. La construction complète prend généralement moins de deux semaines. Il est possible d'obtenir la construction d'un tumulus en laboratoire en fournissant du matériel de construction aux souris. Grâce à un suivi automatisé des individus et des matériaux de construction par RFID, on a pu montrer qu'il existait des spécialistes du transport du matériel végétal, en laboratoire des boules de coton, et des tuiles, des morceaux de plâtre en laboratoire. Les souris spécialistes du transport du coton ne sont pas celles qui seront spécialistes du transport des tuiles que les deux types de matériel soient disponibles séquentiellement ou simultanément. Il s'agit donc d'une réelle division du travail comme on la connaît chez l'espèce humaine et chez de nombreux insectes sociaux. Cette répartition des tâches semble correspondre à un système auto-organisé chez la souris glaneuse et il montre une grande stabilité. En cas de perturbation de la composition du groupe on observe une redistribution partielle des tâches entre les individus mais l'organisation générale reste stable. Dans le cas du transport de coton, on montre qu'il existe une plus grande affinité des spécialistes avec le matériel de construction par rapport aux autres individus mais rien n'est connu concernant le transport de tuiles. Le but de ce stage est de mettre à jour les différences inter-individuelles pouvant expliquer l'émergence de spécialistes. Deux hypothèses non exclusives sont envisagées. D'une part, en parallèle de ce qui a été trouvé pour le transport du coton, il est logique de penser à une différence d'affinité pour les tuiles. Mais contrairement au coton, les tuiles constituent quelque chose de nouveau pour les souris, y compris sur le terrain, et on peut penser qu'une différence de réaction à la nouveauté puisse être en cause. En effet de nombreuses études montrent en laboratoire comme sur le terrain qu'il existe des différences interindividuelles fortes et stables dans le temps et les circonstances. Il s'agit de différences structurales que l'on apparente aux traits de personnalité décrits chez l'espèce humaine. Ces traits de tempérament pourraient être la source de la diversité des stratégies comportementales individuelles telles qu'on les observe en milieu naturel. Il a été suggéré que ces différences interindividuelles de tempérament pouvaient jouer un rôle dans la spécialisation des individus dans le cadre de la division du travail. De plus il a été établi que ces traits de tempérament existaient chez la souris glaneuse et qu'ils influent sur le succès reproducteur des couples.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : l'étude porte sur 10 groupes de 6 individus des deux sexes et issues de portées différentes. Le nombre de groupes (N = 10) permet d'avoir suffisamment de données pour mener à bien les analyses statistiques. Les animaux surnuméraires au sein de chaque portée sont conservés dans le stock de l'élevage.
- Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Il s'agit d'expériences sur le comportement n'entraînant pas de stress majeur pour les animaux. La pose des transpondeurs est une pratique de marquage courante sur les animaux domestiques et a déjà été validée pour l'espèce étudiée. Le maintien en fratrie ne pose aucun problème pour cette espèce et correspond à la structure sociale en milieu naturel.
- Remplacer les modèles animaux. Le modèle animal, en l'occurrence la souris glaneuse, est l'objet d'étude et ne peut donc être remplacé. Les connaissances acquises sur cette espèce peuvent contribuer à améliorer les gestions des espaces agricoles où vit la souris glaneuse.

2729- Les allergies sont très répandues au sein de notre société et ont été classées comme la quatrième pathologie en termes de morbidité par l'OMS. La prévalence des allergies est en constante augmentation, que ce soit dans les pays développés ou non. Elles constituent ainsi un vrai problème de santé publique. Coûteuses, les allergies altèrent aussi la qualité de vie des patients. Par ailleurs, l'allergie alimentaire, très courante peut évoluer vers des manifestations respiratoires plus graves à l'âge adulte, c'est ce qu'on appelle la marche atopique. Des lacunes existent sur les mécanismes de la progression de l'allergie et de son évolution lors de la marche atopique. L'objectif principal du projet est donc de déterminer des marqueurs physiologiques impliqués dans la progression naturelle de l'allergie au cours de la marche atopique. Ce travail nous permettra de développer notre connaissance des mécanismes immunologiques impliqués dans l'allergie et d'améliorer la prise en charge des patients. La recherche dans ce domaine implique l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire et respiratoire. Ainsi l'utilisation de souris est nécessaire pour étudier de façon optimale la réaction in vivo. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué de façon à réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des études in vitro. Dans l'allergie, de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les

lymphocytes ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. De plus, l'allergie est caractérisée par le déclenchement de symptômes, uniquement observables chez l'animal. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Cependant, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations pertinentes pour une application future à l'homme. Ce modèle est bien établi et possède l'avantage de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés du fait de la connaissance et de la précision des paramètres étudiés. Enfin, seul le personnel qualifié et expérimenté participera à l'expérimentation animale. Ces exigences visent à s'assurer que les expériences seront effectuées efficacement et afin de minimiser la souffrance de l'animal. Le nombre de souris sera au nombre de 640 pour la totalité du projet. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

2730- Les maladies autoimmunes touchent 5 à 10% de la population mondiale et sont causées par la dérégulation du système immunitaire qui, en plus de lutter contre les infections, attaque notre corps. Le thymus est l'organe dans lequel sont éduquées les cellules du système immunitaire pour ne pas attaquer le soi. Toute la panoplie des protéines qui nous constituent leur est présentée. Une fois éduquées, ces cellules vont circuler dans le corps et n'attaquer que les corps étrangers qu'elles n'ont jamais rencontrés, comme les microbes. AIRE est la protéine qui va faire exprimer toute la variété de nos protéines par le thymus. Mieux elles seront représentées, en nombre et en quantité, mieux nous serons protégés des maladies autoimmunes.

Le but de ce projet est de comprendre comment AIRE contrôle l'expression des protéines du soi dans le thymus en étudiant le rôle particulier de deux protéines dont la fonction impacte l'effet de AIRE : Dicer et Clp1. Dicer assure la maturation des microARNs et Clp1 joue un rôle dans la terminaison de la transcription. Deux modèles de souris seront générés dans lesquels l'expression de ces deux protéines sera stoppée par un traitement des souris.

Dans ce projet, 18 animaux seront utilisés pour la procédure concernant Dicer et 50 animaux pour la procédure visant à créer des souris lentigéniques avec l'expression de Clp1 modifiée. Tous les animaux, ceux présentant une réduction validée de Dicer ou Clp1 ou non, seront sacrifiés à 5 semaines d'âge.

Dicer et Clp1 sont deux protéines dont la fonction est importante dans la cellule. Les animaux KO pour ces deux gènes ne passent pas le développement embryonnaire. Nous nous attendons à ce que les animaux délétés pour Dicer développent de multiples dommages notamment tissulaires et immunologiques. Cependant, dans la procédure que nous proposons, les animaux seront délétés pour Dicer sur une période maximale de deux semaines afin d'éviter l'apparition de dommages importants. Cette courte période sera néanmoins certainement suffisante pour que l'on puisse observer des différences au niveau transcriptomique.

De même, pour la procédure « Clp1 » les animaux auront une expression de Clp1 réduite sur une courte période. Par ailleurs ces animaux ne présentent pas de délétion totale de Clp1 mais une réduction de son expression dans une fraction de cellules, limitant ainsi grandement les potentiels dommages chez l'animal.

Nous avons choisi comme modèle animal la souris car elles se reproduisent rapidement et ont de nombreuses portées rapprochées. La possibilité d'utiliser des animaux avec des fonds génétiques constants, dans notre cas le fond C57BL/6, permet l'étude de facteurs particuliers. Par ailleurs, une lignée de souris transgénique et inductible pour la délétion du gène Dicer est disponible dans notre animalerie (Dicer flox cre ERT2 +/-). Nous proposons d'utiliser ces souris pour étudier l'effet de Dicer dans le contexte de l'induction des autoantigènes par AIRE dans le thymus.

Dans ce projet, nous aurons recours à un modèle animal car l'induction par AIRE de l'expression génétique n'est que très partielle dans les différents modèles cellulaires que nous avons déjà testés. Les cellules primaires exprimant AIRE meurent très rapidement en culture. De plus les lignées cellulaires immortalisées présentent sous l'effet de AIRE une induction d'un faible degré de similitude avec celle chez l'animal. Ceci suggère l'existence de mécanismes moléculaires sous-tendant l'induction par AIRE chez l'animal que l'on ne modèle pas *in vitro*.

Dans ce projet, les transcriptomes ARNm seront quantifiés par RNAseq sur thymus individuel par une méthode que nous avons déjà éprouvée et qui donne de très bons résultats sur un faible nombre de cellules. Cette stratégie permet d'éviter de pooler les thymus et donc les animaux, permettant ainsi d'en utiliser un nombre significativement plus faible. Outre notre stratégie visant à réduire le nombre d'animaux utilisés, nous limiterons leur souffrance potentielle en arrêtant l'expérience deux semaines après le début du traitement Tamoxifène qui vise à déléter le gène Dicer et deux semaines après le traitement Doxycycline qui vise à induire la réduction de CLP1. Ainsi, les animaux traités seront sujets le moins longtemps possible au stress ou souffrance potentielle induits par les modifications génétiques que nous induirons.

2731- Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier l'activité pharmacologique de la substance active chez l'animal.

Avant cette étude pharmacologique, il est nécessaire d'évaluer l'innocuité des produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments. Cette démarche a pour but d'identifier les effets indésirables et/ou épisodes douloureux liés à l'administration des composés en prévision de leur utilisation chez les animaux engagés dans des modèles complexes chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser la souris, car cette espèce est la plus utilisée dans le cadre du développement des candidats médicaments. A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques impliqués dans les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés pouvant affecter l'activité des candidats-médicaments. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* est nécessaire pour le développement d'un candidat médicament pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux médicaments avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 8, dans des cages de grande taille et enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments pour visualiser tout signe de toxicité imprévue qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'innocuité d'un candidat-médicament à l'aide de 2 souris.

Il est prévu d'évaluer l'innocuité de 20 candidats-médicaments par an (40 souris) sur une période de 5 ans, soit un total de 200 souris.

2732- Dans le Grand Ouest de la France, en 2012, 69% des porcs abattus étaient atteints de pneumonie et 15% de pleurésie. Ces maladies entraînent des pertes économiques importantes pour la filière porcine : réduction des performances zootechniques (croissance, engraissement,...) des animaux affectés, détérioration de la qualité des carcasses, élévation du taux de saisies à l'abattoir et coûts élevés pour les traitements vaccinaux, etc. Au-delà de ces impacts, les maladies pulmonaires présentent un enjeu sur le plan de la santé publique vétérinaire à travers l'utilisation d'antibiotiques et le risque de développement de résistances aux antibiotiques. *Mycoplasma hyopneumoniae* est l'agent initiateur du complexe respiratoire porcin. Au sein de ce complexe deux autres mycoplasmes sont présents : *M. hyorhinis* (Mhr), responsable de polysérites (inflammations simultanées de plusieurs enveloppes (séreuses) qui entourent certains organes) et de pneumonies, et *M. flocculare* (Mfloc), sans pouvoir pathogène établi. Ces trois espèces mycoplasmiques partagent donc une même niche écologique. Cependant, les rôles de Mhr et Mfloc dans la pathologie respiratoire du porc ne sont pas connus.

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier le pouvoir pathogène d'une souche de Mfloc et d'une souche de Mhr, isolées de poumons atteints de pneumonie. Cette procédure permettra de valider les nouvelles méthodes mises en place au laboratoire pour quantifier Mhr et/ou Mfloc dans les tissus atteints ainsi que de disposer de sérums de porcs positifs vis-à-vis de ces deux espèces.

Quinze porcs Exemptes d'Organismes Pathogènes Spécifiés (porcs EOPS) âgés de 7 semaines d'âge seront utilisés (5 porcelets/lot, n=15). Les lots seront inoculés par voie trachéale : soit avec la souche de Mhr, soit avec la souche de Mfloc soit avec du diluant stérile (lot « témoin »). Les animaux seront observés quotidiennement (jours ouvrables) afin de détecter le plus précocement possible une quelconque souffrance (perte d'appétit ou de poids, hypo/hyperthermie, difficultés respiratoires ...). Dans ces cas, les animaux seront euthanasiés. Ce plan expérimental est pensé de façon à minimiser le nombre de porcs utilisés tout en menant une étude suffisamment robuste. Il est en effet indispensable d'avoir au minimum cinq animaux par lot pour considérer la variabilité inter-individuelle. Cet effectif permet également de récolter une quantité suffisante de prélèvements pour valider une méthode de laboratoire.

Il n'existe pas d'alternative à cette étude expérimentale puisque nous cherchons à évaluer l'état de santé général de l'animal cible ainsi que ses réponses immunologiques.

2733- Le mélanome est une tumeur cutanée qui dérive de la transformation maligne des mélanocytes et qui représente un problème important de santé publique en France comme dans de nombreux pays. Le traitement du mélanome cutané repose sur une chirurgie « élargie », mais cela ne permet la guérison que des mélanomes diagnostiqués très précocement. En ce qui concerne les mélanomes métastatiques, le pronostic est beaucoup plus péjoratif, malgré les progrès spectaculaires obtenus ces dernières années dans leur prise en charge thérapeutique. Il est donc nécessaire de mettre en place des programmes de recherche visant à mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la survie, la prolifération et la mort des cellules de mélanome, ceci afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la mise en place de thérapies spécifiques plus efficaces en terme de survie.

LYN est une protéine kinase de la famille SRC, famille connue pour jouer un rôle pivot dans l'oncogénèse. Ces protéines kinases servent d'intermédiaire entre l'activation de récepteurs membranaires et l'activation de diverses protéines jouant un rôle dans la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaire. Elles présentent donc un intérêt tout particulier dans la recherche sur le mélanome de par leur possible implication dans le développement des tumeurs. De plus, la littérature décrit une forte activation de cette famille de protéines kinases dans le mélanome. Nous avons démontré l'implication de la protéine kinase LYN en particulier dans les phénomènes de migration et d'invasion des cellules de mélanome *in vitro*. En effet, l'absence d'expression de LYN conduit à une augmentation du potentiel migratoire et invasif de plusieurs lignées de cellules de mélanome. A l'inverse, la surexpression de LYN *in vitro* dans des lignées de cellules de mélanome diminue les capacités

migratoires et invasives des cellules. Nous avons également observé une perte d'expression de LYN dans plusieurs lignées de cellules de mélanome devenues résistantes au traitement par des inhibiteurs de l'oncogène BRAF fréquemment utilisé en thérapie chez l'homme. Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels LYN exerce ses effets permettrait d'identifier de nouvelles cibles cellulaires dans le but d'améliorer le pronostic et/ou le traitement du mélanome.

Afin d'étudier les effets de LYN dans le développement du mélanome in vivo, nous réaliserons des expériences de xéno-greffes et de développement de métastases chez la souris nude, avec des cellules de mélanomes métastatiques dans lesquelles l'expression de LYN sera modulée par différentes approches techniques. Ce modèle animal est adapté à la recherche sur le cancer, car ces animaux ont un système immunitaire affaibli leur permettant de recevoir des cellules d'origine humaine sans risque de rejet. Ce projet de recherche permettra de valider le rôle de la protéine kinase LYN dans le développement du mélanome dans un contexte plus physio-pathologique que lors d'expérimentations de culture cellulaire.

Au cours de ce projet, nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint possible permettant l'analyse statistique des résultats. Tous les demandeurs sont titulaires d'une formation à l'expérimentation animale de niveau B, les animaux seront observés quotidiennement pour une prise en charge rapide de tout signe de douleur, d'inconfort ou de stress. Un nombre total de 576 animaux sera utilisé au cours de ce projet.

2734- Le mélanome dérive de la transformation maligne des mélanocytes. Parmi les cancers cutanés, le mélanome représente en France comme dans la plupart des pays occidentaux, un problème important de santé publique. Le traitement du mélanome cutané repose sur la chirurgie « élargie », mais celle-ci ne permet la guérison que des mélanomes diagnostiqués très précocement. Le pronostic des formes métastatiques est extrêmement péjoratif. Bien que des avancées récentes aient été réalisées dans le traitement du mélanome avec les thérapies ciblées, la plupart des patients traités développe des résistances et il reste à trouver un traitement efficace pour la majorité d'entre eux. Il est donc important de mettre en place des programmes de recherche qui ont pour but de tirer partie des données de la recherche fondamentale pour améliorer les traitements existants. La mutation de RAC1 est la troisième mutation la plus courante dans le mélanome. RAC1 est impliqué dans plusieurs processus cellulaires clés. Il contrôle la prolifération cellulaire, la survie et la migration cellulaire.

HACE1, est une protéine qui régule l'activité de RAC1 en favorisant sa dégradation. Le rôle de HACE1 dans le mélanome n'a pas été étudié jusqu'à présent.

Dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome et des cellules de mélanome primaire, la suppression de HACE1 inhibe la migration cellulaire sans affecter la prolifération cellulaire. D'autre part, la surexpression de HACE1, augmente la formation de colonies et la migration des cellules de mélanome. L'analyse des données cliniques publiques a confirmé les résultats obtenues dans le laboratoire. L'expression de HACE1 corrèle négativement avec la survie des patients atteints de mélanome.

Il nous est donc nécessaire de confirmer le rôle tumorigénique de HACE1 in vivo dans la migration cellulaire et de tester le rôle de cette protéine dans la progression tumorale.

Nous utiliserons dans une première approche des souris nude dans lesquelles nous injecterons des cellules humaines (surexprimant ou invalidées pour HACE1) pouvant émettre un signal lumineux par voie intra-caudale pour suivre les métastases pulmonaires. Ces cellules (A375) expriment un niveau moyen de HACE1 et représentent donc un modèle de choix pour étudier la surexpression et la perte de HACE1. D'autre part, des cellules dont l'expression de HACE1 peut être bloquée, seront injectées en sous-cutanée afin de suivre l'évolution locale de la tumeur. L'avantage de ce modèle de souris nude est l'utilisation des cellules de mélanome humain qui se rapprochent plus de la physiopathologie humaine que les cellules de mélanome de souris. Ces souris possèdent de plus un système immunitaire faible, nous pourrions injecter des cellules de mélanomes humains sans risque de rejet. Finalement, nous réaliserons des injections de cellules cancéreuses murines en sous-cutanées dans un modèle de souris C57Bl6, possédant un système immunitaire complet. L'utilisation de ce modèle permettra d'évaluer le rôle de HACE1 dans le développement des tumeurs en tenant compte du microenvironnement et des cellules immunitaires. L'utilisation de deux modèles de souris permettra d'identifier le rôle des cellules humaines in vivo (dans le modèle de souris nude) d'une part, et de valider ces effets dans un système immunitaire complet (dans le modèle de souris C57Bl6) d'autre part. Nous utiliserons le nombre le plus restreint d'animaux permettant l'analyse statistique. Il y'aura donc 8 animaux par condition. Ce nombre d'animaux permettra une analyse statistique selon le test t de student bilatéral. Afin d'améliorer la validité biologique des résultats; les expériences seront répétées 3 fois. Tous les demandeurs sont titulaires d'une formation B ou A, et les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

Nous utiliserons un total de 192 animaux dans ce projet.

2735- La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Le dispositif utilisé dans cette étude permet de traiter chez l'Homme les adénofibromes du sein et les nodules thyroïdiens.

Cette technologie permet de remplacer certaines chirurgies par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la

possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. Les traitements HIFU sont transcutanés. Si la majorité de l'énergie délivrée est déposée au foyer dans les tissus ciblés, une portion de cette énergie est toutefois déposée dans les tissus traversés par les ultrasons. L'objectif général est d'étudier les éventuels dommages tissulaires sous-cutanés tout en analysant l'efficacité du traitement HIFU sur les tissus ciblés plus en profondeur. L'équipe de recherche souhaite vérifier la réversibilité des dommages sous-cutanés et l'irréversibilité des lésions induites par un traitement HIFU en procédant à des analyses macroscopiques et histologiques plusieurs jours après traitement.

Modèle animal et méthode : Des traitements HIFU seront délivrés sur le foie de porcs. Sa localisation le rend accessible avec le dispositif de traitement HIFU. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet car la peau de porc constitue un modèle reconnu de la peau humaine. Les porcs seront anesthésiés et on appliquera l'énergie HIFU sur le foie par voie externe sous-costale sous contrôle échographique. Le but est de créer des lésions dans les tissus musculaires sous-cutanés. Après traitement, les porcelets seront réveillés pour que le processus de nécrose des tissus hépatique évolue et pour que la régénération musculaire ait lieu. L'euthanasie des animaux interviendra plusieurs jours après l'induction des lésions. La portion de peau à travers laquelle aura été délivré le traitement ainsi que la portion de foie traité seront prélevées pour analyse macroscopique et histologique. Quinze porcelets seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

Dans toute l'expérience clinique avec la technologie HIFU aucune douleur post traitement n'a été observée chez les patients (prostate, thyroïde, vessie). De plus, aucune infection n'est à craindre compte tenu du caractère extracorporel du traitement.

2736- Notre projet a pour but de former les cliniciens à l'implantation et au pilotage du premier cœur artificiel total électrohydraulique bioprothétique, qui participent aux études cliniques en France et en Europe. Pour cela, nous mettons en place un système complet de formation dont la concrétisation passe par une implantation sur l'animal.

La pénurie de greffons cardiaques observée depuis plusieurs années nourrit un besoin croissant d'alternatives thérapeutiques durables et performantes, qui permettront d'assurer une bonne qualité de vie aux nombreux patients qui en bénéficieront. Les caractéristiques uniques de notre dispositif, à savoir la combinaison mécanique/électrique/biologique, nous permettent d'entrevoir une modification majeure dans le paysage de l'insuffisance cardiaque.

Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant au plus proche les réponses physiologiques et hémodynamiques associées à une telle procédure chirurgicale, permettra de répondre au besoin d'apprentissage technique des chirurgiens.

Le veau est le modèle animal le plus adapté à notre dispositif permettant de former les chirurgiens compte tenu de sa compatibilité anatomique et des capacités débimétriques de notre dispositif. De plus, la mise en œuvre d'une assistance circulatoire impose la réalisation de formations chirurgicales *in vivo* afin d'appréhender les phases de purge/sevrage CEC et d'évaluer les risques d'hémostase induits par la pose de ces assistances. L'ensemble des complications cliniques induites par l'implantation de ce dispositif (hémorragies, accidents thromboemboliques), ainsi que les interactions hémodynamiques, chimiques et hormonales (induites notamment par des CEC longues) ne peuvent être simulées ou appréhendées via des simulateurs.

Ces formations s'étendront sous ce modèle durant toute la phase d'étude clinique. Une revue pourra être faite à 36 mois. Ainsi, ces 36 premiers mois nécessiteront l'utilisation de 75 animaux.

L'ensemble de la formation des chirurgiens a été pensée et élaborée pour limiter au maximum le recours aux animaux, tout en assurant un niveau de connaissance et une technique opératoire suffisants. L'apprentissage théorique et technique passe en partie par un ensemble de sessions (présentations, visionnage de film, observations en direct d'implantations) et de formations techniques sur sujet décédé (chirurgie) et sur banc d'essai (pilotage) qui permettent de limiter le nombre d'animaux utilisés. Cela permet aussi de limiter la durée de l'implantation et donc les souffrances qui peuvent en découler pour l'animal.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des veaux. En plus de l'équipe du laboratoire encadrant la formation, un vétérinaire sera présent à chaque implantation afin d'assurer un monitoring plus précis des signes de souffrance ou de douleur des animaux. Ces derniers seront sous anesthésie générale durant toute la procédure. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal. A terme, les résultats de ce projet permettront d'assurer une meilleure connaissance des spécificités liées à la procédure chirurgicale et au pilotage de notre dispositif, la répétabilité de la technique et ainsi d'accroître les chances de survie et la récupération des patients.

2737- Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies conventionnelles et indiqués dans ces cancers. Le cancer des voies aéro-digestives supérieures est le 5ème cancer le plus fréquent en France et représente la 7ème cause de mortalité par cancer. En France, en 2010, on a estimé 14 000 nouveaux cas de cancers ORL et 5000 décès par an. Le traitement repose sur une chirurgie d'exérèse, lorsqu'elle est possible, associée à la chimiothérapie (cisplatine) et à la radiothérapie (photonthérapie) selon les stades et l'extension. Cependant, il existe une nette réduction du volume de tissus sains irradiés lors d'études comparatives de distribution de dose après protonthérapie versus photonthérapie de cancers ORL; ceci permet de prédire une nette réduction des complications après protonthérapie et peut-être d'envisager une augmentation de la dose d'irradiation pour augmenter l'effet anti-tumoral de la radiothérapie.

En plus d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements, nous tâcherons de déterminer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements de référence. Nous déterminerons également si ces marqueurs peuvent être considérés comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le but final est de proposer des méthodes rapides de détection de la perte d'efficacité d'un traitement et donc une réactivité interventionnelle lorsque plusieurs lignes thérapeutiques ont une AMM (autorisation de mise sur le marché). Notre but est également de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour répondre aux besoins des patients atteints de cancers des VADS. Pour ce faire, nous réaliserons différentes études de régression tumorale chez la souris nude.

La procédure 1 a pour but de confirmer que l'inhibition de la « Polo Like Kinase (PLK1) » par un agent pharmacologique, le volasertib, induit une régression tumorale. Ces expériences ont pour objectif de proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancers VADS résistants aux traitements de référence, le cisplatine et la photonthérapie.

La procédure 2 a pour but de déterminer l'effet de la résistance à la photonthérapie ou de la protonthérapie sur la croissance tumorale. Dans cette même procédure, nous déterminerons l'implication de la protéine VEGFC dans les mécanismes de résistance s'établissant au cours du traitement par radiothérapie dans les patients atteints de cancers des VADS.

Cette partie a pour objectif d'apporter une connaissance fondamentale du mécanisme de résistance et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

D'un point de vue éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences in vivo. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Aucun effet néfaste des composés n'est attendu étant donné les données de la bibliographie mais aussi par le fait que la cisplatine est un médicament déjà donné en clinique et que le volasertib est en phase 3 d'essai clinique dans les leucémies aiguës myéloïdes. Le phénotype des souris n'est pas dommageable car il s'agit de souris nude donc sans effet sur leur bien-être) et la prise tumorale en xénogreffe restera localisée. Cependant, nous ne pourrions pas utiliser de dérivés morphiniques qui risquent d'induire de biais expérimental à notre suivi de prise tumorale.

Néanmoins, si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seront prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dûment qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

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

Nous utiliserons pour ce projet un total de 150 souris nude.

Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de cellules humaines. Ce modèle animal est couramment utilisé dans le monde et a été beaucoup utilisé par l'équipe. Ces points majeurs nous permettent de réduire le plus possible le nombre d'animaux nécessaires pour nos études dans la mesure de la significativité statistique.

2738- Le déficit de vitamine D circulante a été incriminé dans la pathogenèse de certaines neurologiques, dont les maladies démyélinisantes, ainsi que dans des maladies psychiatriques. Les études sur des modèles de démyélinisation auto-immune ont montré un effet contradictoire de la vitamine D sur la myéline. En sachant que la vitamine D agit via un récepteur propre (VDR), il nous semble important de connaître l'effet de la perturbation du fonctionnement du récepteur sur la myéline étant donné que le récepteur peut être par la suite une cible pharmacologique à visée thérapeutique.

La myéline peut être étudiée in vivo par IRM, cet axe de recherche en méthodologie étant devenu un axe important de développement IRM. A notre connaissance, aucune étude n'a confronté toutes les méthodes IRM visant l'évaluation de la myéline pour aboutir à un protocole sensible et robuste.

Ce projet se propose d'étudier le rôle de VDR dans la structuration anatomique et fonctionnelle du cerveau de souris en utilisant le suivi in vivo par IRM. Les observations IRM seront confirmées et complétées par une étude histologique et par biologie moléculaire ex vivo. 42 souris de chaque sexe et de chaque génotype (avec et sans VDR) seront utilisées, représentant un nombre total de 168 animaux. Ces souris seront suivies par IRM morphologique et fonctionnelle à 30, 60 et 90 jours de vie afin d'évaluer l'état de la substance blanche et le fonctionnement du cerveau. Un prélèvement du cerveau sera effectué sur 14 souris de chaque sexe et de chaque génotype à 30, 60 et 90 jours, respectivement, pour étude histologique et par biologie moléculaires des oligodendrocytes et de la myéline. Cette étude longitudinale du cerveau en absence de récepteur de la vitamine D nous permettra d'évaluer des phénotypes d'apparition précoce qui peuvent disparaître par la suite en raison de phénomènes de compensation. Nous avons limité la période d'étude à la période pré-pubertaire et jeune adulte car au-delà le phénotype induit par l'absence de gène VDR est préjudiciable au bien être de l'animal.

Notre approche génétique par utilisation de souris dépourvues de VDR (VDRKO) nous permettra de franchir le cap du simple constat d'un effet biologique engendré par l'administration d'un ligand et d'explorer les mécanismes moléculaires sous-tendant cet effet. La finalité de notre travail est de préciser dans quelle mesure l'absence de signalisation par le récepteur de la vitamine D est délétère pour la formation de la myéline et pour le fonctionnement global du cerveau.

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

Réduire: 14 est le minimum pour pouvoir faire des tests statistiques étant donné la variabilité interindividuelle des résultats in vivo et ex vivo d'un individu à l'autre. Par ailleurs, avoir opté pour un suivi longitudinal nous a permis de diminuer le nombre d'animaux.

Raffiner: nous pratiquons systématiquement l'enrichissement du milieu et nous veillons à la préservation d'un groupe social

Remplacement: nous sommes obligé d'utiliser des souris afin de pouvoir étudier par suivi longitudinal en imagerie la microstructure et le fonctionnement du cerveau en présence et en absence de VDR

2739- Nous avons créé une lignée de souris qui porte une mutation du gène myopalladin (Knock-in mypn(P1112L)) qui a été retrouvé dans un cas familial de la cardiomyopathie dilatée (CMD). Cette lignée de souris peut agir comme un modèle murin de cette maladie, et en effet, les échographies de ces souris à l'âge de trois et six mois ont montré qu'elles développent un phénotype de cardiomyopathie dilatée. Une particularité de cette lignée de souris est que nous avons aussi créé une séquence cible silencieuse à côté de la mutation introduite dans le génome des souris. Dans une optique thérapeutique, nous voulons réverser le phénotype CMD en utilisant des virus adéno-associé (AAV) non-dangereux qui contiennent une séquence nucléotidique qui cible la mutation silencieuse et provoque la destruction de l'allèle mutant. Nos objectifs sont donc 1/ de caractériser le modèle d'insuffisance cardiaque myopalladin dépendant pour en comprendre la physiopathologie, et 2/ de tester l'approche thérapeutique par inhibition d'expression de l'allèle mutant (thérapie génique). Pour ce projet nous utiliserons au total 114 souris. Ce nombre est retenu après avoir tenu compte de la règle des "3R" : nous utilisons les tests non paramétriques de Wilcoxon et Kruskal-Wallis pour petits effectifs (Réduire); les procédures douloureuses sont maintenues au minimum (injection d'anesthésique et d'agent thérapeutique ou d'euthanasique (Raffiner)); les animaux phénotypés vivants sont utilisés pour les analyses post-euthanasies (Raffiner-Réduire). Seul le génotype hétérozygote est retenu pour les injections dans un premier temps (Réduire). Des injections sur des homozygotes seront éventuellement nécessaires pour confirmer les résultats (un amendement sera demandé)

2740- Notre objectif est de démontrer que l'histotripsie (thérapie par ultrasons focalisés utilisant le phénomène de cavitation -effet mécanique-) est réalisable sur du tissu cardiaque in vivo en transthoracique de manière complètement non invasive. Nous devons travailler sur le vivant car le mouvement cardiaque est une des principales difficultés pour l'application de cette technologie. L'application de l'histotripsie in vitro (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises (remplacement).

Une étude sur huit moutons à thorax ouvert avec implantation d'une bioprothèse calcifiée en position mitrale a démontré l'efficacité de l'histotripsie en aigu sur le gradient trans-valvulaire diminuant de 50% le gradient et augmentant de plus de 50% la surface d'ouverture valvulaire. L'étape suivante sera de tester cette thérapie à thorax fermé sur un animal dont les caractéristiques de la cage thoracique sont plus comparables à celle de l'homme. Or le sternum proéminent du mouton ne permet pas de réaliser des échocardiographies transthoraciques de qualité et donc naturellement nous sommes tournés vers le porc, qui lui permet de réaliser des échographies de bonne qualité avec profondeur d'image comparable (distance cœur-thorax) à celle de l'homme.

Une étude est en cours sur le lapin qui a principalement pour objet que de tester l'innocuité de la thérapie au niveau cardiaque et surtout cérébral (embols) car la profondeur thorax-cœur du lapin n'est pas du tout comparable à celle de l'homme.

L'enjeu serait de proposer une thérapie non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. L'expérimentation sur le gros animal, de manière non invasive, est une étape indispensable pour démontrer que l'application valvulaire est possible (notamment sur le rétrécissement aortique calcifié) et pour comprendre les limites actuelles de notre technologie (pénétration des ondes à travers la cage thoracique ?, difficultés de suivi du mouvement ?, problème de puissance d'ultrason ?, temps de procédure sur une cible en mouvement ?). De plus, nous avons besoin de travailler in vivo sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle porcin est donc nécessaire : 25 porcs seront requis pour ce projet (la technique sera testée sur valve native des animaux ou sur bioprothèse calcifiée suivant les procédures). Ce nombre permettra de répondre à l'objectif scientifique de ce projet (preuve de concept et de faisabilité) sans utilisation supplémentaire d'animaux. Afin de réduire la souffrance de l'animal, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale.

L'application de l'histotripsie sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie valvulaire, cardiopathie malformative). Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrason), sans chirurgie ni cathétérisme. Cette nouvelle approche si elle s'avère positive transformera la prise en charge des patients avec rétrécissement aortique calcifié.

2741- La rétinopathie pigmentaire désigne un ensemble de pathologies progressives et héréditaires de la rétine qui mène à une cécité irréversible et qui atteint plus d'un million de personnes à travers le monde. Il a été montré que des modèles animaux pouvaient retrouver une vision fonctionnelle grâce à l'expression artificielle dans les neurones rétinien de protéines d'algues ou de bactéries sensibles à la lumière (outils optogénétiques). Cependant, l'intensité lumineuse nécessaire pour obtenir une réponse significative avec ces outils optogénétiques est encore très élevée, souvent au-delà des limites de radiations lumineuses acceptables pour l'œil humain.

Le but de ce projet est de contourner cet obstacle par le développement de stratégies optogénétiques optimisées permettant d'obtenir des réponses significatives à des seuils de stimulations lumineuses acceptables. Notre stratégie consistera à induire une expression localisée de gènes d'origine microbienne à l'aide d'outils viraux optimisés.

Au total 850 animaux seront nécessaires pour ces études incluant les souris sauvages (souris C57BL6) et des modèles de dégénérescence rétinienne (souris rd1, souris rd10 et souris CPFL-/- rho-/-). Ces modèles de dégénérescence rétinienne sont très utilisés par la communauté scientifique. L'utilisation du modèle animal est essentielle dans ce projet car les effets bénéfiques de cette thérapie sur la restauration de la vision ne peuvent être évalués que d'un point de vue intégratif (par exemple, la mesure de la réponse de la rétine à des stimuli lumineux et l'évaluation de la transmission du signal au cortex cérébral ne peut être réalisée qu'in vivo).

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des lambeaux de papier kraft et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2742- Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'Homme. La forme la plus agressive est le glioblastome qui touche 2400 personnes/an en France, avec une survie moyenne de 12-15 mois. Les traitements actuels qui associent la chirurgie et la radio/chimiothérapie, restent non curatifs et souvent limités, avec un manque de spécificité pour les cellules tumorales par rapport au tissu sain, d'où l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler plus spécifiquement les cellules tumorales.

Au laboratoire, un peptide issu des neurofilaments a révélé des propriétés anti-glioblastome in vitro et in vivo. Incorporé dans des cellules de glioblastomes humains ou de gliomes murins, ce peptide induit une inhibition de la prolifération cellulaire et une mort des cellules tumorales par apoptose, sans altérer les cellules saines. Les études in vivo consistant en une injection locale simple de peptide 5 mM chez des rats Fisher femelles porteuses de gliomes ont montré une réduction du volume tumoral et un ciblage de la tumeur par le peptide.

Un tel traitement chez l'Homme suggérerait une administration locale du peptide juste après le retrait chirurgical de la tumeur. Cependant, il est généralement admis que la BHE est altérée par la présence d'une tumeur de glioblastome. Il est donc important de savoir si le peptide peut franchir la BHE pour un éventuel traitement par injection intra-veineuse (IV) en particulier pour les tumeurs inaccessibles par neurochirurgie, ou comme traitement pré-opératoire.

Ce protocole s'organise en 4 études dépendantes les unes des autres.

1-L'étude 1 a pour but de déterminer la dose de peptide efficace pour traverser la BHE et cibler la tumeur. 3 groupes de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de gliomes seront traités avec 3 doses croissantes de peptide par injection intraveineuse.

2-Selon les résultats précédents, l'étude 2 permettra d'évaluer le temps optimal du passage de la BHE par le peptide après son injection chez des rats Fisher femelles adultes porteurs de glioblastome. 5 groupes de 6 rats seront traités avec la meilleure dose de peptide (étude 1) par injection intraveineuse, et les animaux seront sacrifiés à différents temps (1h, 6h, 12h, 24h et 48h).

3-Selon les résultats précédents, l'étude 3 aura pour but de déterminer à quel moment la BHE est la plus perméable au peptide. Pour cela l'étude consistera à traiter 3 groupes de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de glioblastome avec la dose optimale de peptide (étude 1) injectée 7, 14 ou 28 jours après l'implantation de la tumeur. Les animaux seront sacrifiés au temps optimal après l'injection du peptide (étude 2).

4-Enfin, selon les résultats des trois études précédentes, un dernier groupe de 6 animaux recevront aussi une implantation de glioblastome au jour J0 comme décrit précédemment, puis à partir du moment optimal où la BHE est perméable (étude 3), ils recevront une injection quotidienne sur 5 jours de la dose optimale de peptide (étude 1). Les animaux seront sacrifiés une fois le poids limite atteint (perte de poids \leq 20%), pour analyser la présence du peptide et évaluer le volume tumoral par rapport à un groupe de rats contrôles.

Pour chacune de ces études deux groupes contrôles seront également nécessaires pour analyser les résultats : un groupe contrôle de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de gliome non traités, et un groupe contrôle de 6 rats Fisher femelles adultes sains.

Pour les études 1, 2 et 3 un groupe contrôle à la perméabilité de la BHE sera nécessaire pour chaque condition. Ce groupe de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de gliome recevra une injection iv d'Evans Blue 2% (marqueur courant pour étudier la perméabilité de la BHE).

Une fois tous ces résultats obtenus, le passage de la BHE par le peptide et son effet anti-tumoral sur les glioblastome seront également confirmés chez des rats adultes Fisher mâles (selon le même protocole que l'étude 4).

Le nombre total de lots d'animaux est de 36, soit un nombre total d'animaux de 238 rats (216 + 10% en cas de perte liée au protocole chirurgical). Il a été estimé en fonction des protocoles précédemment réalisés par le laboratoire (pour des résultats statistiquement exploitables) en tenant compte des risques inhérents au protocole (anesthésie et atteinte potentielle de point limite).

L'implantation de la tumeur par stéréotaxie sera réalisée sous anesthésie et analgésie et un suivi des animaux sera réalisé tout au long des expérimentations.

L'ensemble de ces travaux respecte la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE, en remplaçant ou à défaut ici, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. En effet, l'analyse de la traversée éventuelle de la BHE par le peptide a été effectuée sur un modèle de cellules normales, et nous n'avons pas trouvé de traversée (remplacement déjà évalué avant d'entreprendre cette étude). Pour compléter l'étude il est indispensable de passer sur un modèle animal ayant une tumeur de

glioblastome dans le cerveau avant de pouvoir tester le peptide sur des patients atteints de ce cancer. Les différentes études ne seront réalisées que sur les rats femelles (car cela a été déjà effectué dans plusieurs études précédentes), et seule l'efficacité du peptide (étude 4) sera réalisée sur des lots d'animaux femelles et mâles (réduction). Comme nous le décrivons dans la saisine, nous avons mis une grille d'évaluation au cas où un animal ou l'autre montrerait une douleur spéciale, et nous arrêterions l'expérience pour cet animal (raffinement). Enfin, un suivi quotidien du bien-être des animaux est réalisé, et 3 personnes sont impliquées dans ce suivi comme indiqué dans la saisine.

2743- L'objectif de ce projet est de produire, à partir de sérum de lapins, un immunosuppresseur sélectif utilisé pour lutter contre les rejets de greffes chez l'homme en période pré et post opératoire (médicament utilisé depuis les années 1980, usage hospitalier uniquement).

L'Autorisation de Mise sur le Marché définit le protocole de production du médicament et comme tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament, elle fixe les modalités d'obtention de la matière active.

Le recours au lapin en tant que producteur d'Anticorps polyclonaux a été évalué en son temps lors du développement du produit. La procédure a été définie pour obtenir la plus grande quantité de matière active par animal et donc afin de limiter le nombre de sujets utilisés (80 à 90 animaux par série, environ 384 séries/an donc 163 200 lapins sur 5 ans).

Depuis la création de cette activité les méthodes de production ont été constamment améliorées pour intégrer toutes les réglementations s'appliquant à l'expérimentation animale (hébergement, formation du personnel, prise en compte de la souffrance animale).

2744- Les maladies cardiovasculaires et cérébro-vasculaires restent un enjeu de santé publique. L'athéromatose demeure la première cause de mortalité dans le monde, précédant les maladies infectieuses et les cancers. Pourtant, des progrès dans le cas de l'infarctus myocardique et de l'accident ischémique, ont été réalisés grâce au développement d'une thérapeutique thrombolytique, qui rétablit le plus rapidement possible le flux sanguin en dégradant le caillot obstruant l'artère ou la veine. Cette approche médicamenteuse est fondée actuellement sur l'administration d'activateurs du plasminogène qui convertissent le plasminogène, à la surface ou à l'intérieur du thrombus, en plasmine, qui « dissout » alors la fibrine, constituant la matrice solide du thrombus.

Cette thérapeutique, malgré sa pertinence, comporte des limitations. La reprise du flux sanguin des vaisseaux obstrués n'est pas toujours obtenue (entre 15 et 40 % des patients). Elle comporte bien entendu un risque hémorragique, en particulier cérébral. Enfin, l'administration doit être obligatoirement réalisée par voie intra-veineuse.

Ces limitations justifient pleinement l'intérêt porté aux mécanismes moléculaires sous-tendant la dissolution de la fibrine et débouchant sur le développement de nouveaux thrombolytiques plus efficaces, plus sûrs et administrables par voie orale. Parmi ces nouvelles molécules avec un potentiel thrombolytique, nos études ont permis de découvrir une toute nouvelle molécule qui in vitro a un fort pouvoir thrombolytique. Avant d'aller plus en avant et confirmer le potentiel très prometteur de cette nouvelle molécule, une étude chez l'animal est nécessaire. En effet, le recours à l'animal est essentiel pour comprendre les interactions entre le vaisseau sanguin et les cellules du sang, notamment les plaquettes. En effet, il existe une étroite collaboration en les plaquettes et le vaisseau dans le développement de la thrombose. Ainsi un modèle animal est essentiel pour étudier l'effet de nouveaux traitements thérapeutiques antithrombotiques et thrombolytiques (dégradation du thrombus) sur ces interactions qui ne peuvent être reproduites à l'heure actuelle in vitro.

Dans ce projet, l'application de la règle des 3Rs se fera par :

- pour la réduction des douleurs, souffrance et angoisse par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Par ailleurs, tout au long des procédures, les animaux seront suivis par des personnes habilitées et expérimentées pour travailler avec les animaux;
- par l'utilisation d'un hébergement agréé, respectent au maximum le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid);
- par la détermination du nombre nécessaire d'animaux réduit au minimum, sans compromettre les objectifs de ce projet et avoir une réponse statistiquement analysable. Ainsi le nombre de souris prévu est de 20 souris.

2745- Les pathologies vasculaires représentent un enjeu majeur de santé publique par le grand nombre de décès, suite à des accidents vasculaires aigus résultants entre autre de la rupture d'une plaque d'athérosclérose.

La tomographie par densité (TDM) par rayons X est une technique d'imagerie médicale en coupe, qui permet d'explorer de façon non-invasive les modifications morphologiques et physiologiques liées à la présence de différentes pathologies. Une méthode complémentaire, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), à la différence de l'imagerie X, offre un très bon contraste des tissus mous. Cependant la résolution spatiale est plus faible.

Une innovation technologique très récente au niveau des détecteurs de rayons X permet potentiellement de s'affranchir d'un certain nombre de limites de la technique TDM standard. Elle permet d'obtenir une information très spécifique sur la présence des différents éléments chimiques dans l'échantillon traversé par les rayons X et d'en obtenir une cartographie de leur distribution, ainsi qu'une quantification.

Dans le contexte de cette technologie nouvelle et innovante, il est crucial de développer des nouvelles stratégies d'acquisition d'images dédiées au diagnostic de l'athérosclérose qui permettent d'exploiter pleinement les avantages préconisés par cette technologie. Ainsi, notre projet vise à développer des stratégies d'acquisition d'images vasculaires sur un nouveau prototype

de TDM, un système d'imagerie spectrale X (Scanner spectral) qui seront ensuite comparées avec des acquisitions utilisant d'autres méthodes d'imagerie, et validées par des analyses histologiques.

Compte tenu du fait que les difficultés de l'imagerie vasculaire in vivo sont l'écoulement sanguin et les faibles doses de produit de contraste accumulées au niveau tissulaire, le développement et l'optimisation doit impérativement se faire chez l'animal et la règle de remplacement ne peut pas s'appliquer.

Deux modèles animaux d'athérosclérose (le lapin et la souris) seront utilisés afin d'investiguer trois types d'agents de contraste. La règle de réduction s'applique pleinement, en effet, notre connaissance du modèle souris pour l'avoir déjà utilisé dans d'autres projets nous permettra d'utiliser un nombre réduit d'animaux (78), de plus, l'imagerie permet un suivi dans le temps du même animal. Le désavantage du modèle souris est la petite taille et l'absence de rupture de plaque détectable par imagerie. C'est la raison pour laquelle, le modèle lapin est également intéressant pour notre projet, la taille de l'aorte abdominale très proche de la taille des artères carotides humaines, ainsi les stratégies d'imagerie développées seront facilement transférables chez l'homme, 45 lapins seront utilisés pour cette phase.

Enfin la règle de raffinement est aussi appliquée, par l'utilisation de cages enrichies : nid, igloo, tunnel pour les souris, bâton et bloc de cellulose à ronger pour les lapins.

2746- Ce projet a pour but l'amélioration de techniques de thérapies cellulaires pour le traitement de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est une maladie du cerveau qui se traduit par des troubles moteurs dus à la mort progressive et accélérée d'une population de cellules appelées neurones dopaminergiques dans une région précise du cerveau : la substance noire. Ces neurones localisés dans la substance noire envoient des projections vers le striatum (autre région du cerveau spécialisée dans la fonction motrice).

Une des approches thérapeutiques expérimentales de la maladie de Parkinson consiste à greffer des neurones fœtaux dopaminergiques dans le striatum. Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation de neuroblastes provenant de fœtus humains, ont abouti à certaines améliorations motrices, mais n'ont pas encore atteint un niveau justifiant leur utilisation en routine. En effet, cette approche pose plusieurs problèmes : le striatum n'est pas la structure cérébrale dans laquelle se trouvent normalement les neurones dopaminergiques, et la source des neurones transplantés est fœtale.

Dans la perspective de développer une approche thérapeutique visant à restaurer les neurones dopaminergiques dans leur structure d'origine, l'objectif de notre projet est d'évaluer le bénéfice de la greffe dans la substance noire (intranigrale) par rapport à la greffe dans le striatum (intrastriatale) de neurones dopaminergiques dans un modèle animal de la maladie de Parkinson. Pour cela, nous utiliserons le modèle de lésion à la 6-hydroxydopamine couramment utilisé chez la souris. Ce modèle est très largement caractérisé dans la littérature et est maîtrisé au sein du laboratoire.

De plus, afin de proposer une source de neurones alternative aux neurones d'origine fœtale, notre projet propose d'étudier la greffe de neurones dopaminergiques provenant de la différenciation in vitro d'une lignée de cellules souches de souris (cellules ES). En effet, l'obtention de précurseurs neuronaux d'origine fœtale pose de gros problème éthique chez l'Homme et leur disponibilité à grande échelle est difficile. A l'inverse, les cellules souches embryonnaires cultivées in vitro ont l'avantage de pouvoir être amplifiées à l'infini. Les bénéfices de ces deux approches de thérapie cellulaire seront ainsi comparés.

A terme, nous souhaitons pouvoir déterminer sur le plan anatomique et fonctionnel quelle stratégie présente le meilleur potentiel thérapeutique.

Notre protocole nécessite la formation de 6 lots de souris composés chacun de 15 individus (différents contrôles, souris transplantées au niveau de différents sites et avec différentes sources de cellules...). Cela représentent un nombre de 90 animaux pour un protocole complet. Grâce à un grand nombre de techniques et de compétences maîtrisées au sein de notre laboratoire, ce protocole devra être répété 6 fois pour pouvoir être analysé par l'ensemble de nos techniques:

- Un groupe expérimental sera analysé en imagerie cérébrale afin d'étudier la récupération fonctionnelle due à la greffe.
- Deux groupes expérimentaux seront analysés par des approches de biologie moléculaire : l'hybridation in situ (les cerveaux doivent être congelés à -80°C) et la PCR quantitative (extraction d'ARN à partir d'homogénats de cerveaux), afin d'étudier les molécules connues pour être impliquées dans la reconstruction de la voie dopaminergique des cellules greffées.
- Trois groupes seront nécessaires pour effectuer des enregistrements électrophysiologiques aux différents sites d'intérêts (Striatum, dans le transplant ou stimulation antidromique).

Afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées dans ce projet, les études de comportement seront réalisées sur ces mêmes groupes de souris. De plus, toutes nos expériences en immunohistologie seront réalisées à partir des cerveaux des souris mises à mort à la fin de ces mêmes procédures.

Ce protocole de 90 souris devra donc être répété 6 fois pour pouvoir être analysé par l'ensemble de nos techniques, ce qui représente 540 individus au total. Enfin, afin de produire des résultats statistiquement valides, chaque expérience devra être reproduite trois fois (n=3). Nous demandons donc l'autorisation d'utiliser un nombre de 1620 souris au cours des 4 prochaines années.

La règle des 3R a été prise en considération. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère in vitro, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences in vitro. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

2747- La dysfonction du ventricule droit pose de nombreux problèmes en cardiologie pour lesquels peu d'options thérapeutiques sont à disposition. On la rencontre fréquemment dans le contexte des cardiopathies congénitales opérées. En effet de nombreux enfants porteurs de ces maladies sont opérés dans la petite enfance et vont bien par la suite de nombreuses années. Cependant à l'âge adulte, ils présentent des dysfonctions ventriculaires droites pour lesquelles un traitement bien défini n'existe pas encore (par exemple pour les Tétralogie de Fallot). Ces dysfonctions droites sont très souvent accompagnées de troubles du rythme sévères et de mort subite. Nos résultats préliminaires indiquent la présence de modifications favorisant la survenue d'arythmies et potentiellement réversibles si prises en charge à temps. Le développement temporel de ces anomalies est peu clair et pourrait pourtant permettre i) d'identifier des marqueurs permettant la détection précoce des patients à risque arythmique élevé ; (ii) de proposer des thérapies adaptées aux patients. Ce projet a pour but de caractériser les mécanismes à l'origine des arythmies lors de la progression de la dysfonction ventriculaire droite faisant suite à la tétralogie de Fallot opérée. Nous identifierons ces mécanismes à différents stades pathologiques grâce à une approche multi-niveaux de l'animal anesthésié, en passant par le cœur explanté, les cellules cardiaques isolées et jusqu'aux mécanismes moléculaires. Cette caractérisation au cours de la progression de la dysfonction ventriculaire droite permettra l'identification de marqueurs précoces de ces arythmies et de cibles thérapeutiques de choix. Ce projet sera développé autour d'un modèle chronique de dysfonction ventriculaire droite chez le porcelet qui mime les lésions d'une tétralogie de Fallot opérée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 24 cochons mimant la réparation de tétralogie de Fallot. Afin d'étudier la progression des modifications pathologiques, les cochons seront étudiés à 2 mois, 4 mois et 6 mois (8 animaux/groupe) post-opératoires. Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité optimale et permettant une analyse statistique fiable. Les animaux pathologiques seront comparés à des animaux contrôles (24 animaux) ayant subi une thoracotomie avec incision du péricarde aux mêmes intervalles post-opératoires. Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors plus aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. Afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires. Bien que les données obtenues à partir de ces études ne peuvent être obtenues à partir d'études informatiques, elles pourront à terme être incorporées à des modèles numériques et participer ainsi au remplacement et à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans de prochaines études, ainsi qu'à leur raffinement. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes expérimentations à la suite les unes des autres ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux.

2748- Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements, chirurgies, Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique, en fonction des études qu'ils seront amenés à faire et de l'évolution des connaissances et pratiques. Le but de ce projet est de décrire le processus d'acquisition de gestes techniques réalisés à Biotrial Pharmacology, au cours des études précliniques.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser 1438 animaux (souris, rats, gerbilles, hamsters, cochon d'Inde, lapins, porcs, chiens, primates) sur une durée de 5 ans. Dans la très grande majorité des cas, il s'agira d'animaux sortant d'une étude et devant être euthanasiés (animaux réutilisés). Plus rarement, il pourra s'agir d'animaux commandés pour une étude mais n'ayant pas été utilisés et devant être euthanasiés. De manière exceptionnelle, des animaux seront commandés spécifiquement dans le but de réaliser cette formation.

La personne en formation sera systématiquement accompagnée lors de sa formation par une personne experte dont la maîtrise est reconnue pour le geste. La formation se divisera en plusieurs étapes : formation théorique, observation, réalisation sous une supervision directe, réalisation sous une supervision à distance. Au cours de chaque étape, le nombre de répétitions pourra varier en fonction de la complexité du geste et de l'aptitude de la personne en formation à acquérir le geste. Pour valider l'acquisition des gestes, la personne experte tiendra compte de critères de réussite et de critères de réalisation, définis pour chaque procédure.

- Remplacement. Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution, qui pourraient restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Ces gestes étant très spécifiques de l'espèce, ils doivent être acquis chez l'espèce cible.

- Réduction. Les animaux seront, dans la mesure du possible, issus d'études et utilisés pour 2 ou plusieurs procédures de ce projet. Une supervision étroite garantira une utilisation optimale des animaux en minimisant le risque d'erreur.

- Raffinement. Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans la zone d'hébergement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec un recherche systématique de points limites. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire, mais devant acquérir une expertise supplémentaire. Ce personnel en formation sera toujours sous la supervision d'une personne experte. [Autorisation abrogée]

2749- La maladie de Parkinson est une atteinte neurologique chronique et aujourd'hui incurable, qui touche 6,3 millions de personnes dans le monde. Les complications de la pathologie conduisent à un fort taux de mortalité et à une baisse de la qualité de vie. Le caractère chronique de la pathologie engendre de forts coûts de santé, pendant une longue durée. Par ailleurs, les thérapeutiques actuelles permettent d'atténuer les symptômes, mais ne sont ni curatives, ni ne ralentissent le développement de la pathologie.

En conséquence, la mise au point d'une thérapeutique novatrice favorisant un arrêt ou un ralentissement de la pathologie apparaît comme primordiale. Des études antérieures in vitro et in vivo chez la souris ont démontré le potentiel protecteur de la stimulation lumineuse proche infra rouge.

Afin d'étayer le potentiel de cette thérapeutique novatrice, nous souhaitons :

optimiser l'effet neuroprotecteur observé pour la maladie de Parkinson valider l'innocuité de l'illumination proche infra rouge ainsi que du dispositif permettant sa délivrance intra tissulaire Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 550 rongeurs. Pour cela, des études seront menées chez des souris traitées au MPTP et sur des rats traités avec de la 6-OHDA, qui sont des modèles très largement référencés de la maladie de Parkinson. Pour l'étude des autres maladies neurodégénératives, les modèles animaux les mieux référencés dans la littérature seront utilisés.

Ces études permettront d'optimiser le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infra rouge et de vérifier son innocuité ainsi que la biocompatibilité des composants d'un dispositif implantable chronique en vue d'une utilisation dans un essai clinique chez l'Homme.

L'intégralité de ce projet sera réalisée dans un souci maximum du bien-être des animaux, selon les règles éthiques de raffinement, réduction et remplacement. Le protocole est conçu afin que les résultats d'une procédure permettent de raffiner le nombre d'animaux prévus dans la partie suivante du protocole en limitant les hypothèses.

2750- 90% des patients atteints de cancer décèdent de leurs métastases. L'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement local est la première étape de la cascade métastatique et, à ce titre, une cible thérapeutique stratégique. Les cancers colorectaux (CRC) représentent la deuxième cause de mortalité liée au cancer et le péritoine est, après le foie, le deuxième site métastatique chez ces patients (carcinose péritonéale (CP)).

A partir de lavages péritonéaux de patients atteints de CP, il a été identifié la présence de cellules tumorales sous forme de cellules indépendantes (isolées) et sous forme de larges sphères tumorales (ST). Ces dernières regroupent une centaine de cellules tumorales cohésives et ont été retrouvées en suspension dans la cavité péritonéale.

Nous avons pu mettre en évidence que ces ST sont capables d'adhérer au péritoine pour entamer un processus d'invasion. Le but de ce projet est donc de déterminer si ces ST sont capables de créer des métastases in vivo. Nous évaluerons leur capacité à passer dans la circulation sanguine pour disséminer de façon systémique et initier des métastases hépatiques ; et générer des métastases locorégionales dans le péritoine.

Pour cela, deux expériences seront réalisées :

La 1ère consistera à greffer des prélèvements de CRC (contenant des ST) dans le caecum des souris: L'objectif est de créer une tumeur au site initial et créer des métastases à distance, ainsi être au plus près de la réalité biologique.

La 2ème consistera à injecter les ST versus cellules indépendantes dans la rate des souris : L'objectif est de faire passer les ST dans le sang (passage par la veine porte) afin qu'elles arrivent au niveau du foie ; cette expérience permettra d'observer la capacité d'invasion des ST dans le foie et leur capacité à créer des métastases.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence la capacité des ST à créer des métastases à distance. Pour ce projet, nous utiliserons 106 souris nudes (immunodéprimées). Ce nombre a été déterminé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude et que ce dernier puisse nous permettre d'obtenir des résultats exploitables afin de répondre à notre problématique.

Le bien-être des animaux sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. Ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires. Les points limites seront les suivants : perte de poids > 20%, comportement anormal (yeux fermés, dos voûté, isolement), apparence physique anormale (automutilation, plaies), gêne pour se déplacer. Nous effectuerons une visite les deux jours suivants les procédures. Les greffes n'induiront pas de douleur au cours du temps mais pour s'en assurer, ces points seront surveillés deux fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur. En cas d'atteinte d'un des points limites, les animaux seront mis à mort dans les 24 heures. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leurs conditions d'hébergement.

2751- Le syndrome métabolique est une association d'anomalies métaboliques et physiologiques qui augmente le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. Une prise en compte globale du régime alimentaire, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, permet d'agir sur l'ensemble des composantes du syndrome métabolique, mais une autre approche ciblée vise à l'identification d'ingrédients spécifiques agissant seulement sur certains facteurs de risque.

Parmi les ingrédients lipidiques, les acides gras polyinsaturés n-3 (ou oméga-3) sont les plus connus pour leur effet bénéfique sur la résistance à l'insuline, la triglycéridémie, ou l'inflammation. Mais d'autres lipides alimentaires ont un intérêt potentiel, et parmi eux les sphingolipides. Les sphingolipides, et en particulier les céramides, sont une famille de lipides très minoritaires chez les animaux et les végétaux, mais essentiels au bon fonctionnement des membranes cellulaires. Un faisceau d'éléments, indique que les céramides végétaux (ou phytocéramides), apportés par l'alimentation, permettent d'augmenter la sensibilité à l'insuline et de diminuer l'inflammation. Cependant, ces études ont l'inconvénient d'avoir été conduites avec des phytocéramides purifiés sans prendre en compte la nature de l'acide gras constitutif de ces molécules, pourtant susceptible de moduler largement leur effet.

Objectif général du projet.

L'objectif du projet est d'analyser les effets des phytocéramides apportés par l'alimentation dans la prévention nutritionnelle du syndrome métabolique chez la souris. Si les résultats montrent des effets bénéfiques, le développement d'un complément alimentaire qui devra ensuite faire l'objet d'une étude clinique chez l'Homme, sera possible.

Plus particulièrement, il s'agira d'analyser l'effet de farines de cameline, une graine oléagineuse de la famille des crucifères déjà utilisée en alimentation animale, dont les variétés diffèrent par leur profil en phytocéramides et par la nature de leurs acides gras. Une pré-étude de 2 semaines portant sur une variété standard de cameline permettra de tester l'acceptabilité de la farine de cameline par les souris, ainsi que la biodisponibilité des sphingolipides (Procédure 1). Si l'acceptabilité est conforme aux attentes, une étude d'intervention visant à la prévention nutritionnelle du syndrome métabolique sera réalisée sur 5 semaines, avec les farines provenant de 2 variétés de cameline différant par leur profil en acides gras (Procédure 2). Dans le cas contraire, le projet sera arrêté.

Outre ses implications en santé humaine, cette étude pourrait apporter des arguments pour promouvoir la culture de la cameline et la valorisation des constituants de sa graine, dans un souci de maintien de la diversité culturelle en Europe.

Nombre et type d'animaux.

Les études seront conduites chez la souris, modèle pour lequel nous possédons l'expertise nécessaire à l'induction et à l'évaluation d'un syndrome métabolique.

Le protocole (Procédures 1 et 2) nécessite 48 souris mâles de souche C57Bl6. Il a vocation à être répété avec d'autres variétés de cameline présentant d'autres profils de phytocéramides, avec un nombre identique d'animaux. A ce stade, il est prévu de mettre en œuvre 4 fois au maximum les Procédures 1 et 2 sur 5 ans, soit 192 (4*48) souris en tout.

Conformité avec les exigences en matière de remplacement, de réduction et de remplacement.

S'agissant d'une étude pré-clinique, il n'y a pas de remplacement possible au vu des critères retenus (mesures de digestibilité et de biodisponibilité, prélèvements de sang et de tissus). L'effectif des animaux pour chaque procédure (pré-étude, Procédure 1 et étude d'intervention nutritionnelle, Procédure 2) repose sur les données de la littérature et sur notre expérience. Le découpage du projet en deux procédures, permettant d'évaluer, lors d'une pré-étude (Procédure 1), l'acceptabilité et la biodisponibilité de l'ingrédient, répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Mesures et prélèvements réalisés.

Lors de ces deux procédures, le poids et la consommation alimentaire (associée à la collecte des fécès) seront mesurés longitudinalement. A la fin de chaque procédure, une prise de sang sera réalisée par ponction intracardiaque sous anesthésie générale gazeuse, puis les souris seront euthanasiées par exsanguination (section de l'aorte), toujours sous anesthésie générale. Des prélèvements d'organes sont effectués post-mortem.

2752- Pour évaluer le risque des produits chimiques pour l'homme, des études sont réalisées sur l'animal de laboratoire et soumises aux autorités réglementaires avant leur mise sur le marché.

Les études décrites dans ce projet correspondent aux études de toxicité à long-terme et aux études de cancérogenèse. Elles donnent des éléments d'information sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée.

Ce sont des études réglementaires et requises par les autorités pour toutes homologations de nouvelles molécules. Elles répondent à des lignes directrices précises décrivant le protocole d'étude (durée, nombre d'animaux, paramètres...). L'évaluation de la toxicité chronique, doit être réalisée sur 2 espèces de rongeurs (rat et souris) et une espèce non-rongeur (chien). L'évaluation du potentiel cancérogène doit être réalisée sur 2 espèces de rongeurs. Lorsque cela sera possible, l'essai combiné de toxicité chronique et cancérogénicité permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, un moindre recours aux animaux, et peut permettre l'obtention de données additionnelles sur la phase chronique par rapport à la conduite de deux essais séparés, et ne compromet pas la qualité des données de la phase chronique ou de la phase de cancérogenèse.

Ces études sont limitées au maximum et viennent en complément d'information obtenues sur des modèles *in silico* et *in vitro*. Mais ne pouvant tester ces produits chez l'homme, ces informations complémentaires chez l'animal sont indispensables pour la réalisation de l'évaluation de risques pour l'homme. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menés sur des études *in vitro*, puis court terme et enfin de 28 jours et/ou 90 jours. De plus, des propositions de réduction et de remplacement de ces études sont régulièrement faites, en application de la démarche des 3Rs.

Le nombre d'animaux sera d'au maximum 560 rats, 460 souris et 32 chiens par étude avec un démarrage d'une à 2 études par année soit un maximum pour 5 ans de 2800 rats, 2400 souris et 160 chiens. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu pour leur bien-être adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites ont été définis par le laboratoire, ils conditionnent l'appel à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'euthanasie précoce de l'animal. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

2753- Pour améliorer les connaissances physiopathologiques dans différents domaines médicaux, l'utilisation d'électrodes de stimulation ou d'enregistrement s'avère indispensable. Dans le cadre d'un projet européen visant potentiellement plusieurs domaines pathologiques, différentes applications sont envisagées : la stimulation cochléaire, les prothèses rétiniennes, la stimulation et l'enregistrement cortical pour le traitement de la douleur ou les interfaces cerveau-machine.

Cette étude consiste à étudier plus particulièrement des alternatives aux électrodes métalliques classiquement utilisées en recherche et en clinique, notamment pour améliorer leur tolérance locale. Dans ce cadre, nous nous proposons d'étudier les électrodes à base de nanotubes de carbone de type diamant dopé nanostructuré dont la grande stabilité chimique et électrochimique et la résistance à l'usure présentent un intérêt certain.

L'évaluation du diamant dopé en tant qu'électrode dans le domaine médical est relativement récente. Il n'existe à notre connaissance aucune donnée dans la littérature présentant ses performances dans le cadre d'implantation chronique. Nous souhaitons donc réaliser sur un modèle rongeur une évaluation d'électrodes corticales utilisées selon un mode chronique et une évaluation d'électrodes pour la stimulation d'un nerf périphérique selon un mode aigu. Nous prévoyons ainsi deux types d'implantations : d'une part des implantations d'électrodes pour vérifier la biocompatibilité corticales sur des électrodes non connectées, et d'autre part, des implantations d'électrodes connectées pour évaluer l'interface électrodes / tissus biologiques et leur capacité à enregistrer ou stimuler électriquement un nerf périphérique.

Dans ces protocoles, le projet prévoit le recours à un total de 170 rats répartis en 105 animaux pour l'étude de la biocompatibilité d'électrodes corticales passives comprenant 2 délais d'études différents (J30 et J90 après implantation), 20 animaux pour l'étude de la biocompatibilité d'électrodes corticales actives et 45 animaux pour l'évaluation de la fonctionnalité d'électrodes pour la stimulation de nerfs périphériques. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire, en considérant que chaque animal est son propre contrôle (région controlatérale des deux types d'implantation). Cette démarche permet de réduire le nombre de rats utilisés sans compromettre la validité des expériences menées et en conservant un nombre d'animaux suffisant pour obtenir des résultats statistiques fiables.

Pour limiter au mieux les contraintes imposées aux animaux, hébergés en groupe afin de garantir leur bien-être social, leur état de santé sera surveillé et évalué quotidiennement au cours de l'expérience. Ceci nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance ou de douleur, voire en appliquant des critères d'arrêt des expérimentations en cas de nécessité.

2754- Les canaux ioniques et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des protéines membranaires essentielles à la communication de nos cellules. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2, l'épilepsie, les maladies cardiovasculaires, les désordres comportementaux. Elles sont également une cible majeure de médicaments agissant par exemple sur la douleur, le travail prématuré à l'accouchement, le rythme cardiaque. Les canaux ioniques génèrent de très petits courants électriques que nous savons mesurer. Ces mesures peuvent nous permettre de mieux comprendre leur fonctionnement et leur dysfonctionnement, et ainsi, mieux caractériser des pathologies et de trouver des solutions médicales rationnelles. En parallèle, nous nous intéressons au développement d'applications biotechnologiques, notamment dans le diagnostic in vitro, le criblage primaire de candidats médicaments et la détection de perturbateurs endocriniens. Toutes les mesures des faibles courants effectuées dans l'ensemble de ces projets sont basées sur des techniques dites "électrophysiologiques" réalisées sur des "œufs" (ovocytes) de Xénopes, gros batraciens sud-africains. Ces ovocytes sont des usines naturelles et se prête à l'étude très efficaces de production de protéines. Elles sont un système d'étude unique de par leur taille gigantesque pour des cellules (~1mm de diamètre), permettant de les manipuler individuellement et de produire plusieurs protéines simultanément par micro-injection d'ARN (copie de gène codant pour les protéines) dans ces ovocytes.

Pour que nos mesures puissent être réalisées, une même cellule doit souvent exprimer plusieurs protéines. Or les cellules de mammifères en culture utilisées pour étudier certaines protéines membranaires présentent une trop faible efficacité de transfection simultanée de plusieurs ADN pour pouvoir utiliser notre méthode de mesure. De même, nous ne disposons pas à ce jour de modèle moléculaire fiable des protéines sur lesquelles nous travaillons pour envisager d'utiliser la modélisation par ordinateur. Il n'existe donc pas de solution de remplacement des ovocytes de Xénopes, essentiels pour l'ensemble de nos études et développements technologiques à fort enjeux en santé.

Sur le plan technique, le prélèvement hebdomadaire des ovocytes de Xénope s'effectue par opération chirurgicale sur animaux anesthésiés. L'état de santé des animaux est surveillé pour intervenir dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt sont dans ce cas prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Les animaux sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Le nombre d'animaux a été réduit à un minimum nécessaire pour atteindre les objectifs de l'étude. Un total de 64 animaux sera utilisé sur 5 ans soit environ 13 par an. Pour améliorer le bien-être des animaux, les conditions d'hébergement sont enrichies de zones d'ombre et de tubes permettant aux animaux de se cacher et de s'isoler selon leur volonté.

2755- Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est un œdème lésionnel pulmonaire survenant quelques heures après une transfusion de produits sanguins labiles. Il s'agit d'un événement rare, mais d'une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Le TRALI immunologique est provoqué par la présence d'anticorps dans les produits transfusés. En raison de sa complexité physiopathologique et de sa rareté, les observations cliniques sont difficilement exploitables. Aussi sa compréhension nécessite-elle des explorations fonctionnelles in vivo dans des modèles animaux.

Le TRALI peut être mimé chez la souris par l'administration intraveineuse d'un anticorps particulier. Au cours des dix premières minutes, un œdème se forme, et ainsi, une insuffisance respiratoire qui peut être objectivée par la mesure des fonctions respiratoires. L'analyse de ces mesures permet de suivre les modifications des paramètres fonctionnels respiratoires, dès la première minute qui suit l'injection de l'anticorps.

Le développement du TRALI dépend de la formation de radicaux libres, sans que l'on sache précisément comment ils se forment au cours de ce processus particulier. Ce projet vise à résoudre cette imprécision en examinant si et comment la neutralisation ces radicaux, ou de l'inhibition de leur formation, protègent les fonctions respiratoires lors d'un TRALI.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Les tissus seront prélevés en fin d'expérimentation pour des études histologiques futures.

Raffiner : Toutes les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie profonde et sur plaque thermostatée pour maintenir la température corporelle.

Remplacer : Les expériences envisagées dans ce projet concernent des processus actuellement non remplaçables par des expériences in vitro. Néanmoins, à partir des résultats obtenus, des études complémentaires in vitro pourront être proposées pour décrypter les mécanismes fins.

Nombre d'animaux prévus : 300 souris.

2756- Malgré des progrès importants dans la compréhension de la physiopathologie des thromboses artérielles, les maladies ischémiques (infarctus du myocarde, la plupart des accidents vasculaires cérébraux et les artériopathies périphériques invalidantes) restent la première cause de morbi-mortalité dans les pays développés. Les plaquettes, qui sont des petites cellules du sang, ont un rôle majeur dans la survenue des thromboses artérielles, par leur capacité à former des agrégats qui bouchent les artères. Elles sont activées par différents agents contenus dans le sang, parmi eux, l'adénosine 5'-disphosphate (ADP). L'ADP active les plaquettes en se liant notamment à une protéine, appelée récepteur P2Y1. Nos travaux antérieurs ont mis en évidence le rôle central de ce récepteur P2Y1 dans l'agrégation des plaquettes en réponse à l'ADP et la survenue des thromboses artérielles, ce qui en fait une cible pour de nouveaux médicaments à visée anti-thrombotique. Outre sa présence à la surface des plaquettes, le récepteur P2Y1 est également présent sur les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux. A ce niveau, il contribue à la régulation du tonus vasculaire et à l'inflammation vasculaire. On sait depuis longtemps que la paroi endothéliale vasculaire joue un rôle important dans la régulation de la thrombose en agissant sur les acteurs de la thrombose. Ainsi les cellules endothéliales activées peuvent libérer des inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes et vasodilatateurs (prostacycline, monoxyde d'azote), des inhibiteurs de la thrombine (comme l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire TFPI « Tissue factor pathway inhibitor ») ou encore des activateurs de la fibrinolyse (comme l'activateur tissulaire du plasminogène t-PA « tissue plasminogen activator »), qui conduisent tous à l'inhibition de la thrombose artérielle. Il est envisagé que le récepteur P2Y1 sur les cellules endothéliales pourrait contribuer à ces phénomènes. Paradoxalement, très peu de travaux concrets ont été entrepris dans cette direction jusqu'ici.

L'objectif de notre projet est d'étudier les contributions à la thrombose du récepteur P2Y1 présent respectivement sur les cellules endothéliales vasculaires par rapport au récepteur P2Y1 des plaquettes sanguines. Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de thrombose généralisé, bien établi dans notre laboratoire, induit par l'injection par voie intraveineuse d'agents pro-thrombotiques à des souris anesthésiées. Les souris totalement invalidées pour le récepteur P2Y1, les souris invalidées pour le récepteur P2Y1 spécifiquement dans les plaquettes sanguines et les souris invalidées pour le récepteur P2Y1 spécifiquement dans les cellules endothéliales vasculaires seront testées dans ce modèle. Ces animaux nous permettront de mieux comprendre les rôles spécifiques des récepteurs P2Y1 des cellules endothéliales vasculaires par rapport aux récepteurs P2Y1 des plaquettes sanguines dans la thrombose. La perspective est d'identifier des cibles thérapeutiques plus ciblées et donc plus efficaces.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées: toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés. En fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever différents tissus.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 196 souris.

2757- En médecine vétérinaire, un certain nombre de protocoles thérapeutiques font appel à des produits disponibles sur le marché humain. Dans le cadre de l'adaptation des protocoles en vigueur chez l'Homme, il est important de déterminer les possibilités d'utilisation de ces produits chez le chien : sécurité, doses optimales, voies d'administrations les plus simples pour les propriétaires de ces chiens. Dans le cadre de l'amélioration des traitements des chiens contre la dermatite atopique, nous souhaitons tester des produits selon un protocole standard qui fera appel à plusieurs voies d'administrations de façon à déterminer le protocole idéal. La sécurité des produits, pour qu'ils soient déposés sur le marché chez l'Homme, a déjà été testée chez l'animal, souvent chez les rongeurs et au moins chez une espèce non-rongeur. Nous avons donc déjà des éléments dans le domaine qui nous permettent d'adapter le protocole. Cette étude fera appel à 6 chiens, nombre minimum nécessaire pour l'obtention de résultats fiables avant de pouvoir utiliser un produit chez les chiens malades en clientèle vétérinaire.

Les chiens seront maintenus en groupes sociaux et dans un milieu adapté avec des jouets, et des moyens de se distraire. Une surveillance quotidienne, ainsi que des temps de socialisation avec leurs soigneurs sont prévus.. Il tient compte d'un planning de test de 2 produits par an sur 5 ans. Si nous testons moins de produits, nous utiliserons moins d'animaux. Ce projet pourra faire l'objet d'amendements, si les besoins de la médecine vétérinaire nous amènent à tester la pharmacodynamique d'autres produits, existant sur le marché humain, que nous souhaiterions utiliser pour soigner les chiens. Dans ce cas, des chiens déjà utilisés dans ces tests, s'ils n'ont pas éprouvé de souffrance durant les essais précédents, pourraient être réutilisés, dans le cadre d'une démarche de réduction, sur avis d'un vétérinaire compétent.

2758- La formation commune de base des étudiants inscrits en pharmacie implique d'aborder des notions fondamentales de physiologie animale et humaine et de pharmacologie. Ainsi, des cours magistraux, enseignements dirigés et travaux pratiques

sont proposés. Ces derniers permettent de sensibiliser l'ensemble des étudiants à la pharmacologie expérimentale et à la compréhension des mécanismes d'action des molécules médicamenteuses.

Avec la réforme des études de santé, des unités d'enseignements optionnelles ont été incluses dans les maquettes de formation. Ces enseignements, permettent de préparer de petits groupes d'étudiants à leur insertion professionnelle. Afin de sensibiliser les étudiants à la méthodologie employée en recherche pharmacologique et aux questions éthiques que posent l'utilisation de l'animal de laboratoire, une unité d'enseignement d'expérimentation animale appliquée à la physiologie et à la pharmacologie est proposée en 2ème et 3ème année d'étude. Cette formation, dispensée à un nombre restreint d'étudiants, a pour objectif d'utiliser leurs connaissances en physiologie du système nerveux central ainsi qu'en pharmacologie moléculaire pour analyser les effets centraux sur la souris de molécules médicamenteuses.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

- la mise en évidence d'une action psychotrope ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information ;

- Le nombre d'animaux utilisé dans le projet est réduit à son minimum. L'unité d'enseignement a lieu 3 fois par an (2 sessions de niveau 1 et 1 session de niveau 2) pendant 5 ans. 10 animaux par session seront nécessaires (2 animaux par lots) soit 30 animaux/an et 150 animaux/5 ans ;

- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur.

2759- Dans le cadre de recherches sur la protection des élevages avicoles contre l'influenza aviaire, le laboratoire demandeur a besoin de vérifier chez les espèces de volailles sensibles à l'infection si plusieurs vaccins utilisés sur le plan international mais non commercialisés en France sont efficaces pour conférer une protection clinique et/ou virologique vis-à-vis de l'infection par différentes souches sauvages du virus de l'influenza aviaire.

L'expérimentation sera conduite chez trois espèces de volailles (poule, dinde, canard, soit trois espèces de volailles potentiellement sujettes à l'infection par les virus influenza aviaires) exemptes d'organismes pathogènes spécifiés. Les animaux seront hébergés en conditions de confinement, et – pour les espèces dinde et cane – au sol et sur litière selon les conditions habituelles d'élevage. Chacun des vaccins étudiés sera administré à 8 oiseaux, selon les protocoles recommandés par les fabricants pour ce qui concerne l'âge et les voies d'administration (voies sous-cutanée ou intramusculaire, habituelles pour les vaccins aviaires). Des prises de sang seront réalisées tous les 15 jours pour vérifier l'apparition dans le sérum des animaux vaccinés des anticorps induits par la vaccination. Lorsque la séroconversion aura eu lieu, les sujets vaccinés seront inoculés avec les virus étudiés, puis ils feront l'objet tous les deux jours d'un suivi clinique ainsi que de prélèvements trachéaux et cloacaux par écouvillonnage. Ces prélèvements permettront de mesurer, par comparaison avec des lots de 5 sujets non préalablement vaccinés, l'impact de la vaccination préalable sur le développement des signes cliniques et/ou la répllication virale aux niveaux respiratoire et digestif. Un point limite à mettre en œuvre sur la base de l'observation clinique a été défini pour limiter à son minimum la douleur des sujets inoculés.

A l'issue de l'expérimentation tous les oiseaux seront euthanasiés et feront l'objet des prélèvements post-mortem de tissus ou d'organes selon les signes observés. Aucune méthode alternative à l'expérimentation animale n'est disponible pour évaluer l'efficacité in vivo des vaccins étudiés, le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire. Les effectifs par lot sont réduits le plus possible : l'étude d'un vaccin chez une espèce aviaire et vis-à-vis d'une souche d'épreuve donnée requiert l'utilisation de 8 sujets vaccinés et 5 sujets témoins, soit 13 sujets. Ces effectifs restent suffisants pour réaliser une analyse statistique à l'aide de tests adaptés aux petits échantillons. Afin de réduire plus avant le nombre d'animaux inclus dans l'expérimentation, il est prévu d'étudier 4 vaccins en parallèle, avec seulement 42 oiseaux, en mutualisant certains groupes témoins.

Au cours des cinq années à venir, il est envisagé d'étudier au maximum 4 protocoles vaccinaux, vis-à-vis d'au maximum 3 souches d'épreuves, chez chacune des 3 espèces aviaires précitées, donc d'utiliser un effectif maximum de 126 dindes, 126 poulets et 126 canards.

2760- L'objectif du projet est de produire un anticorps qui nous permettra de détecter de façon spécifique l'aromatase de lapin. L'aromatase est une enzyme responsable de la production des oestrogènes. Cette enzyme joue un rôle majeur dans la reproduction chez les Vertébrés, mais son rôle est encore mal connu. La détection de cette enzyme chez le lapin, espèce modèle dans nos travaux, est nécessaire. Or, il n'existe actuellement aucun anticorps d'origine commerciale capable de détecter la présence de l'aromatase dans les échantillons biologiques (tissus, sang) que nous collectons chez les lapins que nous étudions. Nous avons donc besoin de produire nous-mêmes cet anticorps.

Les anticorps sont des protéines complexes produites spontanément par le système immunitaire pour neutraliser des agents pathogènes. De façon intéressante, il est possible de provoquer la production d'un anticorps contre une molécule par injection de cette molécule chez un animal, dès lors qu'elle est reconnue comme "étrangère". L'animal qui a reçu l'injection répond en produisant dans le sang un anticorps spécifique de la molécule. Le prélèvement du sang de cet animal permet de collecter les anticorps qui serviront ensuite à la détection de la molécule d'intérêt.

La production d'anticorps contre l'aromatase de lapin sera effectuée par cette méthode chez la chèvre. L'aromatase de lapin (molécule "étrangère" pour la chèvre) sera injectée chez la chèvre âgée d'au moins six mois. Il est possible chez cette espèce et à cet âge de collecter le volume de sang (200 à 300 ml, selon le poids de l'animal) nécessaire au projet sans occasionner de stress ni altérer la santé de l'animal. L'injection sera faite par voie sous cutanée en mélange avec un adjuvant afin d'améliorer la réponse immunitaire.

Il est connu que la spécificité et la quantité d'anticorps produits varient d'un animal à l'autre. Il est donc prévu de pratiquer les injections sur 3 animaux simultanément pour assurer la réussite du protocole. Plusieurs injections de rappel effectuées à intervalle de trois semaines suivront la primo-injection pour augmenter l'efficacité de la production. Le sang sera collecté à la veine jugulaire une dizaine de jours après chaque injection. A la fin du protocole d'injections et de prélèvements, dont la durée sera inférieure à un an, les animaux seront réintroduits dans le troupeau caprin du domaine d'élevage. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les chèvres seront maintenues dans les conditions usuelles de l'élevage caprin dans une structure d'expérimentation.

Aucune douleur, réaction délétère, aucun phénotype particulier ne sont attendus suite à ces injections. Les chèvres seront élevées par le personnel animalier et, dans le cas peu probable d'une apparition de douleur et/ou de réaction cutanée suite à ces injections, prises en charge par le vétérinaire référent.

Le respect du principe des « 3Rs » réside dans les points suivants :

Remplacement par une méthode « in vitro » : Les méthodes de production d'anticorps par des cellules en culture ne permettent pas actuellement d'obtenir de bons résultats, l'efficacité et la spécificité des anticorps obtenus par des cellules en culture n'étant pas toujours satisfaisantes. En revanche, la production par injection de protéine chez des animaux est la méthode qui donne les meilleures chances d'obtenir de bons résultats.

Réduction du nombre d'animaux : 3 animaux seront traités simultanément, pour prendre en compte la variabilité de réponse d'un animal à l'autre, variabilité que l'on ne peut pas prédire. Réduire le nombre d'animaux au-delà de ce nombre risquerait de conduire l'expérimentation à l'échec.

Raffinement : En cas d'apparition d'une réaction délétère, les injections seront arrêtées, et l'animal sera examiné par le vétérinaire référent qui donnera son avis sur les soins à apporter. Si l'état de l'animal se dégrade, sur avis du vétérinaire, l'animal sera euthanasié.

2761- La transplantation d'îlots pancréatiques constitue aujourd'hui une alternative à l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1. Cependant, le manque de donneurs, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs limitent le succès à long terme et le déploiement à grande échelle de cette thérapeutique. C'est pour dépasser ces limites que des dispositifs d'encapsulation, appelés pancréas bioartificiels, ont été mis au point. Parmi eux, notre dispositif permet d'encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur ne serait nécessaire et l'utilisation de différents types de cellules pourra être envisagée.

Des tests in vitro ont déjà montré que les membranes constituant le dispositif étaient imperméables aux plus petits anticorps, les IgG, impliqués dans les phénomènes de rejet. Cependant, ces résultats doivent être confirmés par des tests in vivo, dans un premier temps chez le rat sain.

L'étude consistera à implanter le dispositif d'encapsulation chez une première souche de rats consanguins dont le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, marqueur situé en surface des cellules et permettant la reconnaissance de cellules étrangères) est connu et identique pour l'ensemble des individus. Le dispositif sera ensuite rempli une première fois avec des îlots pancréatiques provenant d'une autre souche de rats consanguins possédant un CMH différent. Un mois après le remplissage du dispositif, des anticorps spécifiques du CMH du donneur seront recherchés dans le sérum de l'animal ayant reçu les îlots pancréatiques. Si aucun anticorps dirigé contre le CMH du donneur n'est détecté dans le sérum du receveur, une nouvelle recherche d'anticorps anti CMH du donneur sera réalisée un mois plus tard. Ces deux tests successifs réalisés à un mois d'intervalle permettent de conclure avec certitude sur le statut immunitaire du receveur, et de ne pas obtenir de faux négatifs en cas de réponse immunitaire retardée. Si les deux recherches d'anticorps s'avèrent négatives une deuxième injection sera réalisée avec une quantité plus importante d'îlots. Cela permettra de déterminer si la réaction immunitaire est dépendante de la quantité de cellules. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de démontrer chez le petit animal que le dispositif d'encapsulation permet de protéger efficacement les cellules en empêchant une immunisation du receveur. De plus, cela permettra de préparer au mieux les études d'immunisation qui seront réalisées par la suite sur le gros animal (porc) et ainsi limiter le nombre d'individus utilisés. Le rat a été choisi pour les similitudes qu'il présente avec l'Homme pour les réponses immunitaires humorales (basées sur la sécrétion d'anticorps) et la disponibilité de souches consanguines avec un CMH connu, qui est un prérequis indispensable pour notre étude. Sa capacité à supporter des chirurgies permettront de limiter les pertes lors de l'implantation des dispositifs d'encapsulation. Nous avons également choisi d'isoler des îlots pancréatiques chez le rat afin de réaliser des greffes allogéniques (donneur et receveur de la même espèce). Le recours à une méthode alternative n'est pas possible, car le dossier nécessaire à l'entrée en phase clinique nécessite de valider la sécurité et l'efficacité du dispositif sur plusieurs modèles animaux. Le principe de réduction est ici appliqué en utilisant un nombre minimum d'animaux qui reste suffisant pour l'obtention de résultats statistiques. Le test qui sera utilisé est l'ANOVA dans le cadre de données paramétriques ou Mann et Withney dans le cadre de données non paramétriques. Ainsi, 15 rats non diabétiques seront utilisés comme receveur d'une première injection d'îlots pancréatiques. En cas d'absence d'immunisation, ces mêmes animaux recevront une deuxième injection de nombre plus important d'îlots. Cela permet d'évaluer l'influence du nombre d'îlots transplantés sur la réponse immunitaire tout en limitant le nombre d'animaux receveurs utilisés. A ces 15 rats, s'ajoutent 280 rats d'une autre souche de CMH connus, qui serviront à isoler suffisamment d'îlots pour réaliser les deux injections. Au total, cette étude nécessitera 295 rats (15 receveurs + 280 donneurs). Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi

que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire.

2762- Aujourd'hui plus que jamais, la compréhension du cerveau et de son fonctionnement complexe, ainsi que des comportements qui en découlent, sont au centre des préoccupations. En effet, l'évolution démographique et l'allongement de l'espérance de vie ont entraîné une mise en exergue du phénomène de vieillissement cognitif et de certains troubles neurodégénératifs liés à l'âge. En 2010, on estimait à 35,6 millions le nombre de personnes vivant avec une démence dans le monde. Ce chiffre devrait atteindre 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050.

La compréhension de ces phénomènes neurodégénératifs et le développement de médicaments pour y remédier sont l'objet de nombreux efforts de recherche.

Le primate non humain (PNH), de par ses facultés cognitives mais également sa proximité phylogénique avec l'Homme, apparaît comme l'un des modèles les plus pertinents pour l'étude de ces questions scientifiques en neurosciences.

L'objectif de ce projet est de développer une plateforme de mesure des performances mnésiques et attentionnelles des PNH afin de déterminer les effets de l'espèce, du sexe, de l'âge, de la hiérarchie et des relations sociales sur les fonctions cognitives. Cette plateforme a de plus pour objectif de permettre d'évaluer les effets pharmacologiques de molécules agissant sur le système nerveux central, potentiels candidats-médicaments pour des pathologies comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

L'originalité de l'approche de ce projet se base sur l'utilisation d'outils innovants qui, de façon non invasive et non contraignante, permettent de récolter un grand nombre de données sur les performances cognitives des PNH.

En effet, dans un souci de répondre à la règle des 3R, des modules de tests cognitifs automatisés basés sur les tests neuropsychologiques réalisés chez l'Homme ont été développés. Cette méthode présente de nombreux avantages, scientifiques tout d'abord, mais aussi en lien avec les exigences de réduction, de remplacement et de raffinement : l'utilisation de modules automatisés permet une augmentation significative du nombre de données par sujet par rapport à une étude classique, ainsi qu'une meilleure standardisation du protocole et donc une optimisation de la qualité des données, permettant donc de réduire le nombre de sujets par étude. De plus, un fort raffinement est apporté par cette méthode, l'ensemble du protocole ayant été conçu de sorte à minimiser le stress potentiellement lié à l'expérimentation. Ainsi, les animaux restent dans leur propre groupe social et peuvent choisir de travailler sur des écrans tactiles quand ils le souhaitent, sans contrainte ni privation, sur la base d'un conditionnement par renforcement positif, i.e. l'obtention d'une récompense alimentaire. Les données scientifiques obtenues sont d'autant plus fiables que le bien-être animal est garanti.

Dans le cadre de ce projet, un effectif de 300 primates, représentant différentes espèces (macaques, vervets, ouistitis, capucins, lémur) et catégories d'âge et de sexe, hébergés en groupe sociaux, pourront avoir accès à ces modules automatisés afin d'évaluer leurs capacités d'apprentissage et leurs performances cognitives (mémoire, attention, acuité visuelle...). Certains de ces sujets (macaques, ouistitis et vervets) seront utilisés pour l'évaluation des effets de molécules développées par l'industrie pharmaceutique.

2763- La formation de métastases cérébrales affecte 10 à 15% des patientes atteintes de cancer du sein métastatique. La progression tumorale peut s'étendre sur plusieurs années, l'apparition de métastases pouvant survenir de nombreuses années après ablation chirurgicale de la tumeur primaire. Durant cette période, les cellules cancéreuses vont acquérir des propriétés spécifiques leur permettant d'envahir différents organes. Cette capacité correspond à un tropisme métastatique organe spécifique.

Dans le cas des métastases cérébrales, les cellules cancéreuses doivent acquérir des propriétés les rendant capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) localisée au niveau des cellules endothéliales qui forment les capillaires cérébraux. En effet au niveau cérébral, les cellules endothéliales présentent des caractéristiques structurales et métaboliques particulières (présence de jonctions serrées, expression de pompes d'efflux...) leur conférant une perméabilité restrictive nécessaire au maintien de l'homéostasie cérébrale. Malgré la perméabilité restrictive de l'endothélium cérébral, certaines cellules cancéreuses franchissent la BHE. La première étape de transmigration des cellules cancéreuses vers le parenchyme cérébral est l'adhésion de ces cellules à l'endothélium de la BHE.

L'objectif de ce projet est donc de comprendre les interactions entre les cellules tumorales de cancer du sein et l'endothélium de la BHE à l'origine de la formation des métastases cérébrales.

Cette étude sera réalisée à l'aide d'un modèle de BHE in vitro mis au point au laboratoire ; La modélisation de la BHE permettant de nous affranchir de la complexité tissulaire à ce niveau. Le modèle cellulaire repose sur la coculture de cellules endothéliales cérébrales (siège de la de la BHE) de souris femelles adultes (âgées de 4 semaines) ensemencées sur filtres et de cellules gliales de souriceaux (permettant la différenciation de la BHE) ensemencées sur fond de boîte.

Dans nos études nous ne pouvons pas utiliser les lignées de cellules endothéliales transformées car celles-ci ne présentent pas toutes les caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique in vivo. En particulier, les cellules issues de lignées transformées ne présentent pas d'inhibition de contact et donc pas de perméabilité restrictive, principale propriété de la barrière hémato-encéphalique. De même, ainsi que nous l'avons démontré précédemment, l'utilisation de lignées cellulaires de cellules gliales ne permet pas d'obtenir une bonne différenciation des cellules endothéliales. Cependant la modélisation permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour une expérience.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 193 souris âgées de 4 semaines et 5 portées de 5 souriceaux, soit 5 femelles gestantes; finalement 223 souris C57 BL/6 en tout. De façon à réduire l'angoisse, les souriceaux soustraits à leur mère tous au

même moment sont maintenus ensemble à la chaleur le plus longtemps possible. Les animaux sont euthanasiés dans des locaux différents des locaux d'hébergement.

2764- Le système nerveux autonome contrôle l'homéostasie du corps, en régulant les fonctions cardio-vasculaires, digestives et respiratoires. De ce fait, il est indispensable pour la survie. Il forme des circuits neuronaux complexes reliant des neurones d'origines diverses. Comment ces circuits se construisent au cours du développement est encore largement inconnu. Nous appliquons les approches de génétique de souris pour mieux comprendre la mise en place de ces circuits au cours de l'embryogenèse. Dans le passé, nous avons montré le rôle comme maître gène du facteur Phox2b dans la formation du système nerveux autonome. Au cours de ces dernières années, nous avons développé des approches génétiques pour mieux appréhender comment se forme le système nerveux autonome périphérique murin. Nous voulons maintenant utiliser les outils de génétique de souris combinés avec une analyse histologique fine pour comprendre sa mise en place chez les mammifères. Nous nous intéresserons notamment a) au développement du système nerveux entérique dont des malformations causent la maladie de Hirschsprung chez l'homme, b) aux rôles d'un module de signalisation et de deux facteurs de transcription et 3) au développement du système pelvien qui commande les fonctions uro-génitales.

La règle des trois R sera suivie de la manière suivante.

Réduction : Nous limitons le nombre de souris utilisées par deux manières : a) Nous travaillons uniquement sur l'embryon ; dans ce cas, on peut obtenir plusieurs animaux du génotype souhaité par femelle gestante, et les génotypes utilisés comme contrôles seront présents dans les mêmes portées. b) Nous travaillons si possible sur des coupes de tissu permettant d'effectuer plusieurs analyses histologiques sur le même matériel. Nous pensons pouvoir limiter le nombre de souris utilisées à environ une centaine par an. Nous estimons que 550 souris soient nécessaires pour mener à bien le projet.

Raffinement : Nous travaillons sur des mutations qui ne présentent aucun phénotype chez les souris adultes, uniquement après croisement entre deux souris mutantes, donc chez l'embryon. Les prélèvements d'embryons seront fait post-mortem, après euthanasie par une méthode règlementaire.

Remplacement : Le projet consiste dans l'étude de l'organogenèse du système nerveux périphérique, qui peut s'observer uniquement in vivo.

2765- Le traitement des cancers, et du mélanome en particulier, a connu plusieurs grandes avancées thérapeutiques ces 5 dernières années avec d'une part les thérapies ciblées qui freinent la multiplication des cellules cancéreuses et d'autre part les immunothérapies qui visent à activer les défenses immunitaires du patient. Dans un avenir proche, les patients bénéficieront probablement d'une combinaison de ces deux stratégies thérapeutiques et il est donc nécessaire de s'intéresser à leurs interactions afin de déterminer la meilleure façon de les associer.

A ce jour, il n'existe pas de modèle in vitro de remplacement validée permettant l'étude du microenvironnement tumoral et de son influence sur la réponse aux thérapies anti cancéreuses. En particulier, le système immunitaire est un système complexe qui implique plusieurs organes et qu'il est donc difficile d'appréhender dans des expériences menées in vitro. Il nous est donc nécessaire de l'étudier sur des modèles in vivo plus complexes tels que les souris de laboratoire.

L'objectif du présent projet est de caractériser l'agressivité et la sensibilité d'un modèle de mélanome immunocompétent aux immunothérapies du mélanome. La caractérisation de ce modèle est un pré-requis à toute étude des interactions entre thérapies ciblées et immunothérapies.

Nous n'avons pas encore l'expérience de ce modèle au laboratoire. Nous prévoyons 10 souris par groupe pour cette étude pilote puis le nombre de souris par groupe sera réduit au minimum nécessaire dans la suite du projet en fonction du taux de prise de ce modèle, de la variabilité de croissance d'un individu à l'autre et de l'amplitude de la réponse aux traitements étudiés. Cette étude nécessitera 60 souris.

L'utilisation de l'imagerie bioluminescente permet de réaliser de nombreux temps d'observation sur les mêmes animaux ce qui permet de réduire d'autant le nombre d'animaux utilisés. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane 2,5% pendant les séances d'imagerie, ce qui réduit leur angoisse. Par ailleurs, la bonne forme des souris sera vérifiée quotidiennement. Chaque souris présentant des signes de souffrance sera euthanasiée dans les 2 heures.

2766- La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POPs) et ses conséquences en termes de transfert dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de plus en plus d'ampleur dans nos sociétés. Les POPs sont des composés chimiques hautement lipophiles et difficilement destructibles. Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxiques, cancérigènes...).

Au plan national, depuis plusieurs décennies de nombreuses crises sanitaires (ex. Gilly-sur-Isère, St Cyprien, Grez-en-Bouère...) ont impliqué la contamination en POPs [ex. dioxines/furanes et polychlorobiphényles (PCBs)] de produits animaux (lait, œufs, viandes...). Afin de limiter les impacts économiques et sociaux associés à ce type d'incident, il apparaît indispensable de développer des stratégies de décontamination efficaces et rapides, afin de proposer une alternative à l'abattage systématique des troupeaux contaminés en cas de crise. Afin d'y parvenir, il est nécessaire de conduire une recherche finalisée visant à acquérir une connaissance fine des mécanismes de transfert des POPs depuis les tissus de stockage (réserves lipidiques : tissus adipeux), vers l'extérieur de l'organisme (via le lait ou les fèces chez le ruminant).

Au sein d'un animal contaminé, la décontamination en POPs est dépendante de leur excrétion hors de l'organisme, qui se fait principalement voire exclusivement via les fèces chez le mammifère non lactant. Le processus de décontamination est alors envisagé en 2 étapes : i) le relargage des POPs depuis les réserves lipidiques vers le sang et ii) l'augmentation du transfert des POPs depuis le sang vers les contenus digestifs, puis les fèces. En raison de leur caractère lipophile, nous faisons l'hypothèse

qu'il est possible d'influencer les flux de POPs via la modulation des dynamiques lipidiques au niveau de ces 2 interfaces (réserves lipidiques-sang et sang-contenus digestifs).

Les objectifs de cette étude sont de tester :

-Les effets de la mobilisation des réserves lipidiques (via la sous nutrition énergétique), comme stratégie de relargage des POPs depuis les réserves lipidiques vers le sang.

-Les effets de l'enrichissement des fèces en lipides (via la supplémentation du régime en lipides non absorbables : huile minérale), comme stratégie permettant d'augmenter l'affinité des POPs pour les fèces et ainsi augmenter leur transfert depuis le sang vers ce compartiment d'excrétion.

Les résultats acquis permettront d'évaluer l'efficacité de cette stratégie et ainsi son intérêt pour les systèmes d'élevage en cas de crise sanitaire.

Le modèle d'étude retenu est la brebis à l'entretien, car :

-il permet de disposer d'un modèle de ruminant de petite taille et d'intérêt économique sans avoir recours à des animaux de grande taille (bovin)

-la brebis présente l'avantage de disposer d'importantes réserves lipidiques sous cutanées, permettant ainsi un suivi cinétique des concentrations en polluants dans cette matrice en effectuant des biopsies à intervalle de temps régulier.

Dans le cadre du dispositif expérimental d'une durée de 16 semaines envisagé et permettant de répondre à ces questions de recherche, les principes de réduction, raffinement et remplacement (3R) sont pris en compte comme suit :

-Réduction : Dans un objectif de réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales, seul 2 lots de 4 et 5 animaux (9 au total) seront utilisés, les 2 stratégies (sous nutrition et supplémentation en huile minérale) étant combinées dans le cadre d'un traitement unique (un lot de 5), comparé à un traitement témoin (un lot de 4). Cela constitue le nombre nécessaire et minimum permettant de mettre en évidence statistiquement les écarts attendus entre traitements. Par ailleurs, il sera procédé par individu, à 4 biopsies sous cutanées de tissus adipeux et à 5 prises de sang sériés sur un pas de temps de 8 semaines. Ces prélèvements in vivo permettront de suivre les cinétiques des teneurs en polluants de ces 2 matrices au sein des mêmes animaux en réponse aux traitements, sans avoir recours à des abattages sériés et en limitant ainsi le nombre total d'animaux utilisés.

-Raffinement : Les objectifs expérimentaux imposent le logement en box individuel qui constituera une source de stress pour les animaux. Cependant, un aménagement spécifique des box permettra que les animaux puissent avoir des contacts visuel, auditif et olfactif entre eux. Le milieu sera enrichi en mettant une brosse et un ballon à destination de chaque brebis. Par ailleurs, les douleurs imposées aux animaux au moment des biopsies seront limitées par une anesthésie locale et si nécessaire par une couverture antalgique adéquate. Enfin, une surveillance accrue du comportement des animaux et de différents paramètres (poids vif et état d'engraissement) sera effectué et mis au regard de points limites.

-Remplacement : cette expérimentation s'inscrit dans un cadre scientifique plus large, où les résultats acquis serviront à paramétrer et à valider la construction d'un modèle mathématique visant à prédire les flux de POPs depuis l'environnement vers les produits animaux. A terme, le développement de ce type d'outil devra permettre de limiter le recours à l'expérimentation animale.

2767- La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la leucémie aiguë de l'adulte la plus commune. En Europe et aux Etats-Unis, l'incidence et le taux de mortalité de la LAM sont d'environ 5 à 8/100.000 et 4 à 6/100.000 par an, respectivement. En dépit d'un taux élevé de rémissions complètes après traitement avec les agents génotoxiques, le taux de rechute demeure très important. La survie globale à 5 ans est seulement de 30-40% chez les patients de moins de 60 ans, et de 20% pour les plus de 60 ans. La chimiothérapie de première ligne est souvent efficace pour éliminer les cellules leucémiques, mais des rechutes éloignées sont observées chez la majorité des patients, caractérisées par l'amplification de clones leucémiques chimiorésistants. L'ensemble de ces données justifie le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique.

Dans ce contexte, notre plateforme propose à ses partenaires industriels une approche permettant de tester l'effet potentiellement bénéfique de leurs produits à l'aide de modèles précliniques faisant appel à des souris immunodéficientes xénotreffées avec des cellules leucémiques humaines. Un de nos partenaires a identifié une nouvelle cible thérapeutique et développé des inhibiteurs de celle-ci qui font l'objet d'une caractérisation de leur activité antileucémique in vitro. C'est pourquoi l'objectif de ce projet est d'apporter la preuve, à l'aide d'un modèle préclinique au sein de notre plateforme, que le plus efficace in vitro de ces inhibiteurs, le composé BKS0349, offre un bénéfice thérapeutique in vivo et de comparer son efficacité au traitement de référence (l'Aracytine : AraC).

Dans ce but, dans quatre protocoles séquentiels, 2 lignées leucémiques humaines puis 2 échantillons cliniques, tous les 4 particulièrement sensibles au BKS0349 in vitro, seront transplantées dans la voie veineuse de souris immunodéprimées (NSG). Puis, nous évaluerons la prolifération leucémique en fonction des traitements soit en monothérapie, soit en combinaison. Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement tumoral des lignées cellulaires se fera par des mesures cinétiques utilisant un procédé non invasif, à savoir l'imagerie optique in vivo par bioluminescence. L'ensemble de ces procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse (Vetflurane). Pour le bien-être des souris, nous disposerons en tant qu'enrichissement des copeaux de bois compactés et du coton pour la nidification dans les cages.

De même, nous utiliserons un nombre minimum mais nécessaire de souris, évalué à un total de 148.

2768- Les recherches menées au sein de notre laboratoire ainsi que les demandes faites par nos clients vont nous amener à former notre personnel sur des techniques d'expérimentations animales basiques ainsi que sur des techniques de chirurgies.

Celles-ci feront le cadre de formation interne encadrée par le responsable de projet ainsi que le vétérinaire référent. Ces formations seront de degré de sévérité différentes: une classe légère (contention, identification par bague, prélèvements sanguins, administration par injection (Intra-Péritonéale (IP), Sous-Cutané (SC), Intraveineuse (IV), Intramusculaire (IM) et Per-Os), et une classe modérée: chirurgie légère (ovariectomie, splénectomie, trépanation...).

Dans le cadre de ces projets de formation interne et ceux pour une durée totale 5 ans, on estime une moyenne de 100 souris (C57-BL/6J Rj ou SWISS) et 100 rats (Sprague Dawley OFA) par an soit un total de 500 souris et 500 rats sur 5 ans. Par soucis de respect des règles des 3R ce nombre sera revu à la baisse si le besoin ou la demande de formation sont moins élevées d'une année à l'autre. Le but étant que le personnel soit formé dans les meilleures conditions en un minimum de temps avec la possibilité de se réentraîner selon les besoins et les demandes.

Le respect du bien être animal passera par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées (traitement analgésique ou euthanasie par des méthodes reconnues).

2769- Le lymphome est une pathologie cancéreuse dont la fréquence a énormément augmenté ces 40 dernières années. Il se traduit par le développement de tumeurs au sein des ganglions mais également au sein de la moelle osseuse. Ce projet a pour but de tester et d'optimiser diverses thérapies anti-cancéreuses utilisées actuellement dans le contexte clinique pour le traitement des lymphomes folliculaires chez l'humain. Notre précédent projet nous a permis de développer un modèle murin de lymphome folliculaire humain. Ce modèle est hautement dépendant du microenvironnement tumoral et il sera réutilisé dans ce nouveau projet et comparé à d'autres modèles déjà existants tels que les xénogreffes intraveineuses et sous-cutanées afin d'évaluer et de comparer l'efficacité de différentes thérapies et l'impact du microenvironnement tumoral.

Ce projet consiste en un test de différentes thérapies dirigées contre le lymphome telles que le Lénalidomide, le rituximab et la chimiothérapie. Les tumeurs sous-cutanées et métastatiques (injection intraveineuse de cellules tumorales) ainsi obtenues pourront être étudiées et comparées aux tumeurs dépendantes du microenvironnement obtenues lors d'une greffe intrafémorale. Pour cela, les souris greffées en sous-cutané et en intraveineuse recevront le même traitement que les souris greffées en intrafémoral et seront analysées par les mêmes techniques : prélèvements de sang, de moelle osseuse, imagerie de bioluminescence.

Les animaux seront tout d'abord pré-conditionnés afin de leur induire une hypoplasie médullaire à l'aide d'un traitement par hydroxyurée (procédure expérimentale 1). Les souris seront xénogreffées selon 3 voies différentes avec des cellules de lymphome folliculaire (DOHH2) seules ou accompagnées de cellules stromales humaines de soutien (ADSC): la voie intrafémorale (procédure expérimentale n°2), la voie sous-cutanée (procédure expérimentale n°3) ou la voie intraveineuse (procédure expérimentale n°4). L'ensemble de ces cellules seront bioluminescentes et permettront de suivre par imagerie l'évolution hebdomadaire de la maladie chez chaque animal (procédure expérimentale n°8). De plus, des prélèvements itératifs de sang et de moelle osseuse seront réalisés sur chaque animal toutes les 3 semaines. Les animaux xénogreffés recevront un traitement par Lénalidomide (procédure expérimentale n°5), Rituximab (procédure expérimentale n°6) ou chimiothérapie (procédure expérimentale n°7) à différentes doses afin de déterminer les conditions de traitement les plus efficaces.

Le choix de la souris NSG repose sur le fait que ce type de xénogreffe requiert une souche immunodéficiente dépourvue de lymphocytes T, B et NK afin de potentialiser la prise de greffe.

Le respect de la règle des 3R se traduit par:

-le Remplacement: le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement tumoral adapté (cellules stromales de différents types, facteurs de croissance...). Ce microenvironnement n'est pas reproductible in vitro et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

-la Réduction: ce projet comprend 660 souris car il nécessite de tester un grand nombre de paramètres différents : le type de xénogreffe (intrafémorale, sous-cutanée ou intraveineuse), les cellules implantées (DOHH2 avec ou sans cellules stromales), le type de thérapie anticancéreuse (lénalidomide, rituximab, chimiothérapie) et la dose administrée pour chaque thérapie. Il faut également comptabiliser tous les lots de souris « contrôle » indispensables à la réalisation de cette étude et les 60 souris qui seront commandées auprès du fournisseur pour faire l'élevage. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

-le Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées: locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids, du volume tumoral et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé.

Lorsque nous aurons établi les conditions de traitement donnant les meilleurs résultats pour le Lénalidomide, le Rituximab et la chimiothérapie, une nouvelle saisine sera soumise afin d'utiliser ces conditions pour faire de la thérapie combinée telle que Lénalidomide + Rituximab ou Lénalidomide + chimiothérapie actuellement en développement dans le contexte clinique.

2770- La maladie de Pompe (glycogénose de type II) est une maladie génétique progressive souvent fatale, consécutive à un déficit en alpha-glucosidase acide (GAA). Il en résulte une surcharge en glycogène dans les muscles à l'origine d'une faiblesse musculaire et de difficultés respiratoires. Chez le nourrisson atteint de la forme grave, le coeur est sévèrement affecté conduisant à un décès avant l'âge de 2 ans. L'administration intraveineuse à vie de l'enzyme recombinante GAA permet de

corriger la cardiomyopathie et d'augmenter l'espérance de vie des patients. Cependant, ce traitement est partiellement efficace sur les muscles malgré des doses élevées. Il est lourd et contraignant, nécessitant une administration de plusieurs heures toutes les deux semaines et d'un coût très élevé (~500 000 euros/patient/an)..

Plusieurs stratégies thérapeutiques sont développées dont la thérapie génique ciblant le muscle squelettique, le diaphragme et la thérapie cellulaire par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Les cellules injectées sont implantées dans le tissu cible où elles sécrètent l'enzyme manquante de façon continue, permettant la correction de l'organe.

L'objectif du projet est de mettre en place une stratégie de thérapie génique ex vivo ciblant :

1/ les muscles squelettiques à l'aide de cellules souches adultes progénitrices myogéniques. Les cellules injectées sécrèteront l'enzyme GAA et s'ancreront à proximité des cellules déficientes du muscle squelettique, qui recevront l'enzyme GAA en quantité élevée.

2/ le cœur avec des cellules souches pluripotentes induites (iPSc) différenciées en cardiomyocytes. Le bénéfice par rapport au traitement actuel portera sur la réduction des coûts et l'allègement du traitement puisqu'une administration unique de cellules devrait corriger le cœur à long terme.

Le design expérimental respectera le principe des 3R :

- Remplacement. L'utilisation d'un modèle murin présentant les caractéristiques de la maladie est le modèle le plus pertinent pour évaluer l'efficacité thérapeutique du traitement. Les animaux utilisés seront des souris doubles transgéniques GAA-KO / LC3-GFP, et des souris WT (utilisées comme contrôle). Au total, 204 animaux seront inclus dans le projet.

- Réduction. Des groupes de 4 animaux seront constitués pour les expérimentations menées à court terme (21 jours) de manière à s'affranchir du geste de l'opérateur lors des injections. Pour les expérimentations à moyen et long terme (3 et 11 mois), des groupes de 10 à 12 animaux seront réalisés, ce qui représente un nombre nécessaire pour constituer des groupes représentatifs et analysables d'un point de vue fonctionnel. Une étude statistique (Analyse de variance ANOVA et test de Student) sera effectuée en comparant les résultats des tests moteurs et des courbes de survie des animaux malades traités versus non traités et sains, afin de mettre évidence un éventuel bénéfice thérapeutique.

- Raffinement. Tous les animaux auront libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée des expériences. Les animaux seront surveillés tous les jours par les animaliers prévenant rapidement le chercheur et le vétérinaire d'une quelconque anomalie.

Une grille comportementale a été mise en place afin d'évaluer la douleur chez l'animal et les critères limites justifiant un arrêt prématuré du protocole et l'euthanasie des animaux. Ces critères concerneront l'apparence générale des animaux, leur poids, les signes cliniques apparents ainsi que leur comportement. En fonction du score obtenu lors du suivi hebdomadaire, des dispositions adaptées seront prises (cf grille d'évaluation de la douleur : envoyée en Annexe car n'a pas pu être intégrée dans le corps du texte puisqu'il s'agit d'un tableau)

2771- La génération de souris et de rats génétiquement modifiés est indispensable pour l'analyse fonctionnelle de gènes, la génération de modèles de maladies, le développement de médicaments et pour des applications biotechnologiques.

Le choix du rat présente pour de nombreuses études de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme que la souris. Et il a été précédemment démontré que certains modèles de rats transgéniques ou Knockout (délétion du gène) reproduisent mieux les pathologies humaines que les modèles souris existants (ex: HIV, HLA B27, DMD...)

Notre plateforme est la seule structure académique produisant à façon des rats transgéniques, Knockout (délétion d'un gène) ou Knock-in (insertion d'un ADN) pour des partenaires académiques ou privés qu'ils soient français ou étrangers.

Suite à l'avancée depuis les 4 dernières années, des techniques d'ingénierie du génome qui ont permis la création de modèles de rats KO et KI, cela permet à de nombreux chercheurs d'envisager la création de nouveaux modèles. Nous utiliserons ce modèle de rats transgéniques afin d'être utilisés dans la création de nouveaux modèles utilisable par la communauté scientifique

Nous limiterons donc au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 1500 rats (femelles et mâles). Les procédures mises en place nous permettront d'optimiser la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). Afin de réduire, en fonction des résultats statistiques obtenues sur les modèles in vivo, les différents groupes expérimentaux pourront être diminués. Afin de raffiner, des procédures visant à diminuer la douleur (lidocaïne) seront mis en place. Nous allons donc pour cela réutiliser dans d'autres protocoles certains animaux non utilisés dans ces procédures. Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal.

2772- L'épilepsie du lobe temporal (TLE) est une des formes d'épilepsies parmi les plus réfractaires aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle-seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique.

Le modèle souris dit MTLE constitue un modèle validé de cette forme d'épilepsie chez la souris. Il consiste en l'injection d'une micro-goutte d'acide kainique dans le cerveau d'un animal sain, rendant l'animal épileptique dans le mois qui suit, avec les mêmes symptômes que ceux observés dans le cadre des TLE humaines. Nous nous intéressons particulièrement à l'installation de l'épilepsie (épileptogénèse). Une meilleure compréhension des processus impliqués dans l'épileptogénèse pourrait potentiellement mener à des stratégies préventives visant à empêcher l'apparition de la maladie caractérisée par des crises récurrentes.

L'objectif de ce projet vise à identifier par Imagerie de Résonance Magnétique (IRM) certains biomarqueurs de l'épileptogénèse. L'IRM à haute résolution spatiale permet de suivre in vivo et chez le même animal de manière non invasive, les éventuelles réorganisations neuro-anatomiques qui apparaissent au cours du temps.

Cette étude sera réalisée sur trois lignées de souris consanguines (n=14 souris par lignée soit 42 souris au total), présentant différents profils d'installation de l'épilepsie.

L'élaboration des procédures expérimentales a permis de minimiser d'éventuelles souffrances des animaux avec une détermination précise des points limites. Le choix d'utiliser la souris comme modèle animal répond à l'objectif d'utiliser l'espèce « la plus acceptable d'un point de vue éthique ». En effet, Il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en suppléance à l'approche in vivo puisque nous souhaitons suivre les modifications structurelles au cours de l'épileptogenèse. Chez l'homme, l'épileptogenèse est déjà bien engagée quand les patients sont pris en charge dans les services cliniques. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses. De plus, l'utilisation de l'IRM permet de réaliser un suivi longitudinal de manière non-invasive chez les mêmes animaux et par là-même de réduire le nombre d'animaux utilisés au total. Enfin, l'utilisation de la souris dans ce protocole peut également se justifier par nos solides connaissances sur le modèle d'épilepsie.

2773- Le rejet des organes transplantés est aujourd'hui contrôlé par l'administration de traitements immunosuppresseurs aux patients. Cependant, ces traitements deviennent toxiques à long terme. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors nécessaires pour réduire la dose et la durée d'administration des traitements immunosuppresseurs.

Nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la transplantation d'organes, la morbidité et la mortalité restent beaucoup plus élevées dans la population de patients transplantés que dans la population générale. Ceci est principalement dû aux effets secondaires des immunosuppresseurs et au phénomène de rejet. Ainsi l'un des objectifs en transplantation est de comprendre les mécanismes du rejet et d'induire une tolérance spécifique du greffon qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur. La transplantation est un processus dont la complexité ne permet pas une étude basée exclusivement sur des expériences réalisées in vitro et nécessite également des étapes avant le passage à l'Homme. Pour en étudier les mécanismes, nous devons donc faire appel à des modèles de greffes chez l'animal.

Un des modèles que nous avons mis au point dans notre unité est le modèle de greffe de peau chez la souris. Ce modèle présente de nombreux avantages, notamment la survie du greffon est facile à suivre. Par rapport à d'autres modèles, nous pouvons profiter d'un seul donneur pour greffer 3-4 receveurs. De plus, plus d'outils sont développés chez la souris en comparaison avec d'autres animaux, ce qui facilite le travail de recherche.

Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux et les procédures mises en place

Nous permettrons d'optimiser la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner).

Le nombre d'animaux défini sera de 264 souris. (210 femelles et 54 mâles).

Les animaux seront anesthésiés par injection d'un mélange Kétamine/Xylazine qui donne anesthésie et analgésie pour la greffe. Pour l'injection et l'indentification par bague les souris seront anesthésiées par inhalation d'Isoflurane 3.5 à 4% dans la boîte d'induction et 1.5 à 2% au masque.

Les animaux devront être rasés afin d'observer le greffon si nécessaire. Pour ce faire ils seront endormis dans la boîte d'induction comme ci-dessus.

Pour le raffinement les souris auront du coton dans leur cage

2774- La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire dégénérative caractérisée par une dégénérescence des photorécepteurs. Chez les patients souffrant de RP, la perte de vision se développe en deux étapes successives. Chez l'homme la cécité est due à une perte du segment externe du photorécepteur à cône, la partie photo réceptrice de la cellule, tandis que les corps cellulaires des cônes ainsi que les cellules bipolaires et ganglionnaires peuvent rester en vie longtemps après la perte de la vision. Plusieurs approches de thérapie génique utilisent des vecteurs viraux codant pour des protéines thérapeutiques afin de réactiver ces cônes « dormants ». Ces vecteurs viraux sont injectés sous la rétine, entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) afin de cibler spécifiquement les photorécepteurs (PR). La fonction importante de l'EPR est la phagocytose des segments externes des PR, ces deux types de cellules sont physiquement liés. En conséquence la séparation forcée entraînée par l'injection sous rétinienne de vecteurs viraux entre ces deux couches reste problématique en thérapie génique oculaire.

MEK inhibiteurs ce sont des médicaments qui sont utilisés pour affecter le MAPK/ERK voie le quel est très active dans les cellules cancéreuses. Les MEK inhibiteurs sont utilisés dans des essais cliniques pour le traitement de certains cancers. Un des effets secondaires indésirables est une perte centrale de champ visuel, complètement réversible quelques jours après l'administration du MEK inhibiteur. Cette perte centrale du champ visuel est induite par le décollement transitoire de la rétine. La cause physiologique de ce décollement reste à élucider.

Notre projet s'articule autour de 2 axes :

1. La compréhension physiologique du décollement observé après administration de MEK inhibiteur

2. Utilisation de MEK inhibiteur afin d'induire un décollement sous rétinien et ainsi faciliter l'injection de vecteurs viraux sous rétinien.

L'introduction du produit MEK inhibiteur sera effectuée par injection intra oculaire (intra vitrée). Nous testerons différentes doses jusqu'à l'induction du décollement rétinien, ensuite nous caractériserons les changements de la structure de la rétine suite à l'injection intra-vitréenne de dose minimale de MEK inhibiteur pour induire le décollement de la rétine chez la souris. Ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 90 souris sur une période de trois ans. Nous avons pris en compte la règle des 3Rs pour ce chiffre.. Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : - on fait la cinétique en utilisant les

méthodes comme l'imagerie du fond d'œil par Micron III et par OCT qui permet de visualiser in vivo et de manière non-traumatisante pour l'animal le processus pathologique au niveau de la rétine sans sacrifier les animaux ; - on utilise une seule concentration par groupe d'injection dans un œil de souris consanguin afin d'avoir un groupe statistiquement homogène et résultats statistiquement significatifs ; - décision pour la concentration suivante sera prise après obtention de résultats où pas d'induction de décollement de la rétine dans le groupe expérimental précédent afin de minimiser le nombre d'animaux pour l'expérience ; - en plus afin de minimiser le nombre des animaux utilisés l'expérience sera arrêtée après obtention de la dose d'injection du MEK inhibiteur minimal qui peut être utilisé pour induire le décollement de la rétine. Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, par l'amélioration des techniques opératoires – utilisation d'anesthésie et analgésie des animaux inclut l'analgésie locale adéquate, protection de la cornée pour réduire la souffrance et le stress de l'animal tout en obtenant des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés.

Replace (Remplacer) ne peut pas être effectué car l'induction de décollement de la rétine peut être effectuée seulement sur les yeux de mammifère in vivo.

Les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la notion de points limites (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

2775- Notre projet consiste à mieux comprendre les mécanismes physiologiques des bénéfices thérapeutiques observés dans des protocoles de stimulations cérébrales profondes chez des patients atteints de troubles obsessionnels compulsifs (TOC) résistants. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiées, appelé souris SAPAP3-KO, qui est particulièrement adapté à cette étude car il exprime des comportements répétitifs pathologiques. Pour ce projet nous envisageons de réaliser des tâches comportementales ciblées et automatisées pour réduire le nombre d'animaux à utiliser (estimation de 100 souris nécessaires pour l'ensemble du projet). Nous proposons de traiter les souris mutantes avec des stimulations optiques de populations cellulaires (technique dite d'optogénétique) de circuits neuronaux identifiés comme étant responsables de symptômes compulsifs. Cette approche nous permettra de mieux identifier les effets des stimulations cérébrales profondes chez l'homme pour le traitement des TOCs.

Pour ce projet nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux utilisés en utilisant des tests automatisés pour diminuer la variabilité des comportements. Ces systèmes automatisés nous permettent également de raffiner les expérimentations du fait des conditions écologiques, limitant l'interaction stressante avec un expérimentateur de manière répétée.

2776- Ce projet de recherche étudie les projections des neurones qui coordonnent la communication entre les régions opposées du cerveau. Chez les humains et beaucoup d'autres mammifères, le cerveau est divisé en deux hémisphères droit et gauche qui diffèrent dans leur anatomie et leur fonction. L'activité synchrone du cerveau exige une communication entre les deux hémisphères. Les deux hémisphères sont réciproquement liées par des ponts neuronaux appelés "commissures cérébrales", qui incluent le corps calleux (CC). Il est important de comprendre les mécanismes de développement des commissures et comment des défauts dans ces processus affectent le fonctionnement du cerveau. En effet, l'agénésie commissurale (affection neurologique dans laquelle une ou plusieurs commissures cérébrales ne se développent pas) est la malformation cérébrale la plus fréquente et est associée à de nombreux syndromes héréditaires chez l'homme comme l'agénésie du CC (AgCC). Le présent projet va permettre de mieux comprendre le développement des commissures, ce qui devrait offrir une meilleure compréhension de l'étiologie des agénésies totales ou partielles et contribuer à l'identification d'indicateurs de pronostics pour les patients.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Ainsi ce projet utilisera 454 souris sauvages et 572 souris génétiquement modifiées soit 1026 souris au total.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, seuls les mammifères possèdent un CC qui permet des fonctions cognitives supérieures. Il n'existe pas de lignées cellulaires spécifiques des différentes sous-populations des neurones callosaux. Les études in vitro ne permettent pas de suivre le développement in situ des projections. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles d'agénésie callosale.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés.

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

2777- *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène important associé aux infections systémiques chez les patients brûlés.

Cette bactérie a développé de nombreuses stratégies de résistance aux antibiotiques, induisant une réelle menace et justifiant la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Une lactonase nommée SsoPox-W263I (produite par notre laboratoire) a montré in vitro et in vivo sa capacité à réduire la virulence de *P. aeruginosa*.

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de cette molécule dans un modèle expérimental d'infection de brûlure avec *P. aeruginosa*. La complexité biologique des brûlures avec sur-infection bactérienne est un élément important qui ne peut être étudié que par des modèles animaux.

Le modèle consiste à engendrer des brûlures (10 x 10 mm) dans le dos de souris sous anesthésie générale, puis 30 minutes après, infecter ces brûlures avec *P. aeruginosa* par voie sous cutanée. Juste après infection la lactonase seule ou sous forme de pansements est mise sur ces brûlures pour mesurer son effet antibactérien. Des groupes d'animaux traités avec un antibiotique seul ou antibiotique en association avec la lactonase, ou un groupe non traité seront également inclus à titre de groupes contrôles.

Les critères d'évaluation de l'effet protecteur de la lactonase seront le taux de la mortalité, la charge bactérienne au niveau du sang, la peau prélevée au niveau de la brûlure après sacrifice des animaux, et dans les différents organes (poumons, foie et rate). Nous étudierons également l'aspect histologique au niveau des organes prélevés. La réponse cytokinique sera également mesurée.

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées, eau et aliments à volonté. A noter que de la nourriture hydratée sera également ajoutée dans chaque cage pour rendre la nourriture plus accessible aux souris après brûlures. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide du matériel de nidification pour réduire toute angoisse.

Toutes les étapes de ce projet seront réalisées sous une anesthésie générale et pour réduire la douleur engendrée par les brûlures, une analgésie est mise en place tout au long de l'expérimentation. La perte des fluides sera compensée par injection d'une solution saline et les animaux seront surveillés bi-quotidiennement pour déceler une quelconque souffrance dans le but de la limiter. Le cas échéant, les animaux seront euthanasiés si certains "points limites", définis au préalable, sont atteints. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, poumons, et peau). Pour ce projet 360 souris seront utilisées. Ce nombre a été calculé sur la base de la mortalité prédite de l'infection par *P. aeruginosa*.

2778- Les anticorps monoclonaux (Acm) occupent une place de plus en plus importante sur le marché du médicament et constituent une classe thérapeutique majeure. Ils sont utilisés dans de nombreuses maladies telles que les maladies inflammatoires, auto-immunes ou cancéreuses. Les développements pharmaceutiques de ces dernières décennies ont abouti à la mise sur le marché de plus de 30 anticorps thérapeutiques et des centaines d'Acm sont en cours d'évaluation. Malgré le succès évident de cette classe de biomédicaments, certains patients ne tirent que peu de bénéfice de ce type de thérapeutique à cause de l'immunisation de ces personnes contre ces Acm. Le but général de cette étude est, grâce à l'utilisation de souris femelle, d'évaluer l'efficacité de 10 nouveaux Acm en répondant aux questions suivantes :

*A quelle vitesse l'anticorps est-il consommé par l'organisme et quelle est la réponse de l'organisme contre ce médicament (immunisation) ? Pour cette partie nous utiliserons 24 souris par anticorps soit 240 souris sur l'ensemble du projet.

*L'anticorps est-il efficace contre les différents types tumeurs ? Pour cette partie nous utiliseront 24 souris par anticorps soit 240 souris sur l'ensemble du projet.

*Quel est le rôle du système immunitaire dans la réaction au médicament ?

Pour cette partie nous utiliseront 12 souris par anticorps soit 120 sur l'ensemble du projet.

Le total des souris utilisées sera donc de 600 souris sur 5 ans et permettra une étude complète de 10 anticorps thérapeutiques. Le projet présenté répond à la règle des 3R:

Remplacement et Réduction : le recours au modèle murin est absolument nécessaire avant toute commercialisation d'un nouvel Acm mais le nombre de souris utilisé a été réduit à son maximum grâce à l'étude de la demi-vie de chaque Acm qui permettra grâce à une modélisation mathématique d'affiner au plus juste la dose d'Acm utilisée dans la suite du projet. Des études préalables de ces anticorps ont été effectuées dans des modèles in-vitro (en culture cellulaires) permettant de remplacer certains tests in-vivo et de réduire le nombre de souris utilisées. Raffinement : les souris seront élevées en communauté dans des cages enrichies avec du papier et des fragments de boîte à œuf. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse ou fixe comprenant l'utilisation d'un collyre ophtalmique antibiotique. Tous les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale en fin de procédure.

2779- Clec-1 est un récepteur Lectin-like de type C qui présente de propriétés immuno-régulatrices. Les résultats préliminaires montrent l'expression de clec-1 par des cellules dendritiques et cellules endothéliales. Cette expression est diminuée par des stimuli pro-inflammatoires et augmentée par les molécules tolérogènes IL-10 et TGF β . Clec-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler la réponse effectrice des LT CD4+ notamment les Th17. Ces résultats suggèrent que Clec-1 pourrait agir comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en modulant la polarisation Th17.

Nous avons généré des rats KO pour Clec-1 grâce à la technique des "Zinc Finger Nuclases". Ces rats vont permettre de déterminer le rôle de Clec-1 dans le développement et la fonction de différents types cellulaires dont les cellules dendritiques et dans divers types de réponses inflammatoires innées ou adaptatives.

Nous comparerons ces rats à des rats non mutés au cours d'un modèle de lésions psoriasiformes induites par l'AldaraTM. Ce modèle a été largement décrit dans la littérature et repose sur la propriété de l'AldaraTM à induire, lors de son application locale, une réponse inflammatoire proche de celle observée dans le psoriasis, impliquant la réponse Th17.

Pour cette expérimentation animale, nous utiliserons au total 32 rats (16 rats non mutés et 16 rats mutés déficients pour Clec-1) dans 4 séries : les deux premières permettant un suivi clinique, et les deux deuxièmes utilisée pour des analyses biologiques. Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux retenu a été calculé afin de permettre une interprétation fiable des résultats (Réduire). En accord avec cette même règle, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter

la souffrance des animaux (Raffiner). Enfin, l'utilisation d'un modèle animal est justifiée par l'absence de systèmes in vitro alternatifs permettant d'analyser la complexité de Clec-1 dans la peau (Remplace).

Clec-1 pourrait représenter un outil thérapeutique important pour moduler une réponse immunitaire.

Clec-1, alors, pourrait être un candidat important à une utilisation thérapeutique dans le psoriasis, permettant de réduire les effets délétères à travers de l'inhibition de la réponse immunitaire effectrice des LT CD4+ notamment les Th17. Cependant, une meilleure compréhension de la régulation et des actions du Clec-1 dans un modèle préclinique de psoriasis est un préalable nécessaire avant d'envisager une transposition chez l'homme.

2780- L'obésité est associée à des troubles neurocomportementaux, physiologiques et métaboliques bien décrits chez l'Homme et le modèle miniporc. Cependant, nous ne savons pas encore dans si ces anomalies sont principalement dues à la prise de poids, ou si la consommation d'aliments palatables riches en gras et en sucre, indépendamment d'une prise de poids, peut suffire à induire des anomalies cérébrales, digestives ou comportementales, voire favoriser ultérieurement l'installation d'une obésité. De même, nous ne savons pas dans quelle mesure une perte de poids significative chez l'obèse (induite soit par le régime soit par la chirurgie bariatrique de type by-pass), peut conditionner l'émergence d'une plasticité neuronale et la mise en place d'un basculement dans les processus hédoniques et cognitifs qui pourraient favoriser la régulation des comportements alimentaires. L'objectif de ce projet de recherche est de réaliser pour la première fois une étude longitudinale sur un modèle animal pertinent (N=24 animaux au total) qui permettra d'explorer sur les mêmes sujets les mécanismes neurocognitifs et métaboliques altérés par 1) la consommation chronique d'aliments palatables sans prise de poids (N=16 vs. la consommation d'un aliment équilibré N=8), 2) la mise en place d'un état d'obésité via la consommation ad libitum d'un aliment palatable et hypercalorique (N=16), et 3) une perte de poids induite soit par une chirurgie bariatrique, soit par un régime restrictif (N=8 pour chaque groupe). Les diverses mesures réalisées lors de ces trois étapes du protocole permettront de décrire les trajectoires individuelles et leur infléchissement en fonction de l'environnement nutritionnel et/ou de l'intervention thérapeutique employée pour lutter contre l'obésité. Elles pourraient également permettre de décrire de nouveaux biomarqueurs capables de prédire la susceptibilité de déclarer une obésité ou de répondre favorablement à un traitement. Des tests comportementaux permettront d'étudier les préférences et la motivation alimentaires, ainsi que les capacités cognitives des sujets. L'activité cérébrale sera estimée grâce à la tomographie d'émission de positons (18F-fluorodesoxyglucose), méthode non invasive requérant l'anesthésie des sujets. Chez certains animaux, une chirurgie bariatrique de type by-pass Roux-en-Y (N =8) ou une chirurgie fantôme (N=8) sera réalisée. Après une pré-anesthésie à la kétamine (5 mg/kg), l'anesthésie sera induite sous masque à l'isoflurane (3-5% v/v) puis poursuivie sous intubation. Un niveau chirurgical d'anesthésie sera maintenu tout au long de l'acte réalisé sous monitoring. L'analgésie sera complétée au réveil par une dose de chlorhydrate de morphine sous cutanée (10 mg in toto) et un traitement antibiotique prophylactique sera appliqué. Une procédure d'anesthésie similaire sera utilisée durant les séances d'imagerie cérébrale, mais sans analgésie puisque l'imagerie est totalement indolore. Lors de l'imagerie, des prélèvements de sang seront effectués pour doser certaines hormones gastro-intestinales pouvant servir de marqueurs de l'obésité. Fèces et urines seront prélevés pour réaliser une étude métabolomique et voir dans quelle mesure les différentes interventions prévues influencent le microbiote. Les données physiologiques et comportementales seront analysées par ANOVA à multiples facteurs pour étudier les effets du traitement, du sexe, des étapes du protocole et de leurs interactions. Les données issues des imageries cérébrales seront analysées par cartographie statistique paramétrique (SPM) qui représente la méthode de référence pour ce type d'analyse. Les effectifs animaux utilisés pour cette étude correspondent à un minimum pour bénéficier d'une puissance statistique appropriée aux mesures réalisées. Les approches d'imagerie et de chirurgie ont été choisies et raffinées de manière à être le moins invasif possible (i.e. imagerie in vivo sur animaux anesthésiés, chirurgie par célioscopie). Enfin, le modèle miniporc est le seul modèle animal chez lequel des anomalies cérébrales similaires à celles décrites chez l'Homme obèse ont été mises en évidence. Aucune approche ex vivo ne permettrait de répondre aux objectifs annoncés.

2781- Les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique, sont des maladies complexes et multifactorielles affectant le tractus gastro-intestinal et dont la physiopathologie n'est que partiellement élucidée. Le nombre de patients atteint par ces maladies augmentant, de nombreux traitements ont été mis en place (ex : glucocorticoïdes, immunosuppresseurs). Cependant, ces traitements possèdent d'importants effets secondaires et peuvent aussi se révéler inefficaces chez un grand nombre de patients.

D'autres voies thérapeutiques font donc l'objet de recherches. Il a été montré que l'activité de certaines protéases présentes au sein de la muqueuse intestinale augmentait chez les patients et que cette hyperactivité favorisait le maintien de l'inflammation dans la muqueuse. Au vu de ces observations, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases appelés serpins semble être une approche thérapeutique à exploiter.

Le but du projet est de révéler chez un modèle de souris le potentiel anti-inflammatoire de serpins produites naturellement par des bactéries intestinales. En fonction des résultats, de nouveaux médicaments à base de ces molécules pourraient être développés pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin.

Le modèle de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des maladies inflammatoires de l'intestin (augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, symptômes cliniques tels que le sang dans les selles...). Ceci explique la forte utilisation de ce modèle dans les études sur ces maladies et sa présence au sein du projet.

Au cours de la première procédure, les serpins seront quotidiennement inoculées par gavage aux souris, pendant les 7 jours d'administration du DSS via l'eau de boisson. Un suivi clinique journalier des souris sera effectué jusqu'à la mise à mort de ces

dernières, à la fin de l'administration du DSS. Il en découlera un score clinique permettant de déterminer l'intensité clinique de la pathologie. D'autres analyses effectuées sur le côlon des animaux prélevé après leur mise à mort, ainsi que sur leurs fèces, permettront de quantifier l'inflammation d'un point de vue macroscopique et microscopique. Durant la seconde procédure, un microbiote de sujet humain atteint de maladie inflammatoire de l'intestin sera inoculé à des souris axéniques (souris sans microbiote intestinal, élevées dans des bulles stériles). Une fois le microbiote du malade installé chez la souris, l'administration quotidienne pendant 3 semaines des 3 serpins qui se seront révélées les plus efficaces dans la procédure 1 permettra de vérifier que ces molécules n'ont pas d'effet néfaste sur le microbiote intestinal du malade. Cette procédure sera répétée avec plusieurs malades. Aucune colite ne sera induite chez les souris de cette procédure.

Utiliser uniquement une approche *in vitro* pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir au sein de l'hôte (hormones, système immunitaire entre autres); de ce fait le recours aux animaux est indispensable. Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer : Des tests préliminaires *in vitro* permettront de sélectionner les serpins les plus actives contre les protéases. Les 10 plus actives seront retenues pour l'étude *in vivo*.

Réduire : Le nombre de souris nécessaire a été défini à l'aide d'études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer dans ce projet un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Pour la procédure 1, 6 séries permettant de tester chacune 2 serpins, ou combinaisons de serpins, seront mises en place. Chaque série sera constituée de 5 groupes expérimentaux de 8 souris recevant tous du DSS (2 groupes traités avec les serpins, 2 groupes témoins ne recevant pas de serpins, 1 groupe témoin soigné avec un traitement de référence). Le nombre total d'animaux pour la procédure 1 est alors de 240 souris. Pour la procédure 2, 4 séries permettant d'étudier l'effet des 3 meilleures serpins ou combinaisons de serpins sur l'équilibre du microbiote de 4 malades seront mises en œuvre. Chaque série comprendra 5 groupes de 8 souris (3 groupes recevant les serpins d'intérêt, 2 groupes témoins ne les recevant pas). Le nombre total de souris pour la procédure 2 est de 160. Ce qui nous amène à l'utilisation de 400 souris pour l'ensemble de ce projet.

Raffiner : Les souris seront hébergées par 4 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, humidité...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels en carton pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper. La durée d'administration du DSS dans la procédure 1 sera courte (7 jours) afin de limiter le développement des lésions au strict nécessaire pour révéler l'effet anti-inflammatoire des serpins.

2782- Notre projet vise à explorer les altérations des réseaux corticaux induites par une activité épileptique. Notre objectif général est à la fois de mieux comprendre les mécanismes de génération des crises mais également, à travers l'étude de ces altérations, d'explorer les mécanismes fondamentaux de modulation et de plasticité de la transmission synaptique susceptibles d'offrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des épilepsies chroniques. Nous nous intéressons particulièrement aux conséquences fonctionnelles d'une perte d'expression du transporteur ionique KCC2 observée dans l'hippocampe épileptique ainsi que dans plusieurs modèles animaux d'épilepsie et d'autres maladies neurologiques.

De nombreux travaux associent une altération du transport du chlore dans les neurones à des syndromes d'épilepsie du lobe temporal (ELT), une forme d'épilepsie de l'adulte particulièrement résistante aux pharmacothérapies actuellement disponibles. Cependant, le lien causal entre ces altérations et l'émergence de crises récurrentes, dont la prise en charge est souvent difficile, demeure méconnu. Notre projet vise à explorer l'impact d'altérations du transport neuronal du chlore dans l'hippocampe épileptique sur l'activité des synapses et des réseaux. Notre objectif est d'identifier des mécanismes qui pourraient représenter de nouvelles cibles pour prévenir l'émergence d'un réseau épileptique.

Nous testerons pour cela les conséquences d'une suppression génétique chronique de l'expression d'un transporteur neuronal KCC2 sur les propriétés intrinsèques des neurones et sur l'activité du cortex hippocampique. Nous rechercherons en particulier si des activités anormales, de type épileptique, peuvent être induites par la suppression de ce transporteur. Si tel est le cas, nous en étudierons les mécanismes sous-jacents en vue de tester le bénéfice thérapeutique d'agents pharmacologiques ciblant certains transporteurs ioniques (notamment des diurétiques) sur la survenue des crises.

Pour cela, nous aurons recours à une approche d'invalidation de l'expression du transporteur KCC2 par interférence ARN ou d'expression d'un peptide agissant comme dominant négatif sur l'interaction de KCC2 avec divers partenaires intracellulaires. Cette approche nous permettra de distinguer les effets liés à la perte de fonction du transporteur de ceux liés à ses interactions notamment avec le cytosquelette d'actine.

Nos travaux antérieurs nous ont permis de valider *in vitro* l'utilisation de ces approches dans des neurones hippocampiques en culture et de caractériser leurs conséquences cellulaires en réduisant ainsi au minimum le nombre d'animaux requis.

Nous souhaitons à présent en explorer les conséquences fonctionnelles en termes d'activité de réseaux neuronaux et d'émergence des crises. Ces travaux seront menés chez le Rat pour des raisons à la fois liées à la taille et au comportement de l'animal (qui facilitent plusieurs procédures expérimentales) mais également parce qu'il s'agit d'un standard dans notre domaine de recherche, ce qui facilitera la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature et de nos collaborateurs. Ces expériences reposent sur une analyse des altérations du comportement et de l'activité électroencéphalographique induites par une perturbation de l'expression de KCC2, et requièrent donc par définition une expérimentation sur l'animal. Toutefois, tous les animaux mis en œuvre dans cette étude seront utilisés pour 2 voire 3 approches expérimentales afin de réduire leur nombre au strict minimum. En outre, les conditions de stabulations sont contrôlées avec enrichissement, et toutes les

procédures sont mises en œuvre en limitant au maximum le stress et la douleur chez l'animal, respectant ainsi les recommandations en termes de Réduction, de Raffinement et de Remplacement en matière d'expérimentation animale.

Nombre total de rats utilisés dans ce projet : 660

2783- Les anticorps thérapeutiques ont révolutionné la prise en charge de certains cancers. Leur efficacité thérapeutique dépend de nombreux paramètres, notamment leur distribution et leur demi-vie dans l'organisme et au sein de la tumeur. Ceux-ci sont gouvernés par le récepteur FcRn ou récepteur néonatal pour le fragment Fc des anticorps qui contribue à prolonger la demi-vie sanguine des anticorps thérapeutiques *in vivo* et à assurer leur distribution dans les tissus. Récemment, ce récepteur est aussi apparu comme un récepteur « clé » dans le développement tumoral, en participant à la surveillance immunitaire anti-tumorale. Notre groupe a montré, comme d'autres auteurs, que l'expression de ce récepteur pouvait : 1/être réprimée dans certaines tumeurs solides, comme celles du poumon ; et 2/ directement corrélée au pronostic vital des patients. Dans ce projet, nous proposons de mieux comprendre l'impact de la répression de FcRn dans le développement des tumeurs pulmonaires et dans la réponse au traitement par anticorps thérapeutiques.

Le projet est organisé en 5 procédures visant à étudier le rôle du FcRn dans la tumorigenèse et l'impact de la modulation de son expression sur la réponse au traitement avec des anticorps thérapeutiques. Au total, nous utiliserons 588 animaux sur 3 ans. Il s'agira de souris sauvage (WT ou « sauvage », n=294) et de souris invalidé pour le FcRn (FcRn KO, n=294).

Afin de respecter la Règle des 3R : Raffiner les souris seront élevées en communauté dans des cages enrichies avec du papier et des fragments de boîtes à œuf. La grande majorité des procédures sera réalisée pour limiter la souffrance des animaux (anesthésie, collyre ophtalmique antibiotique, ...). Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité d'un organisme entier (réponse thérapeutique à une infection) et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de cancer pulmonaire sont relativement bien établis et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme. L'utilisation d'animaux dans cette étude est indispensable, car les anticorps thérapeutiques ont besoin d'effecteurs comme les lymphocytes T ou le complément pour agir. De plus, ils induisent souvent des réactions immunitaires qui nécessitent d'être explorées. Réduire : Lorsque cela est possible, des analyses *in vitro* seront réalisées en amont pour limiter les études chez l'animal. Les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter le nombre d'animaux. La souris est le modèle le plus adapté pour ces études précliniques car nous pouvons étudier la pharmacologie et l'efficacité de ces médicaments en présence (souris WT) ou absence du FcRn (souris transgénique FcRn KO).

2784- Des mutations du gène LMNA, codant les lamines A et C, sont responsables de dystrophies musculaires associées à des atteintes cardiaques. Deux mutations identifiées chez les patients ont été reproduites chez la souris (musculus sur fond mixte C57bl/6 / 129Sv) par Knock In. La première (LmnaDelK32) localisée sur l'exon 1 provoque à l'état homozygote la mort des souris avant l'âge de 3 semaines suite à un retard de la maturation des muscles striés et des défauts métaboliques sévères et à l'état hétérozygote une cardiopathie dilatée causant la mort des souris à l'âge de un an. La deuxième (LmnaH222P) localisée dans l'exon 4 provoque une dystrophie musculaire modérée, sans déficit musculaire évident, associée à une cardiopathie dilatée causant la mort des souris vers l'âge de 8 mois.

Une des hypothèses pour expliquer la dystrophie musculaire dans cette maladie est que la réponse du muscle adulte à une lésion musculaire ou à l'hypertrophie est perturbée dans les laminopathies du muscle squelettique. L'objectif de notre projet est d'évaluer l'adaptation musculaire à une surcharge de travail dans nos deux modèles KI, afin ainsi, de comprendre la physiopathologie de la dysfonction musculaire :

La plupart des analyses ne peuvent pas être reproduites *in vitro* ni *ex vivo*, ce qui nécessite l'utilisation des modèles murins adultes que nous avons mis en place. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre une significativité statistique, nous allons procéder à calcul itératif afin d'estimer le n pour 1-beta (puissance) et 1-alpha (niveau de confiance) donnés dans un setting expérimental représentatif qui dépend de deux variables mutant/sauvage et dénervation/non dénervation (par exemple). Par cette approche, nous avons estimé que cent cinquante souris sont nécessaires pour mener à nos projets et permettre l'analyse statistique des différences observées. Nous allons comparer des animaux de différents génotypes à différents temps. Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données. En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules musculaires seront utilisées pour disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. De la Buprénorphine est administrée au moment de l'anesthésie afin de renforcer l'analgésie (durée d'action de 8 à 12h permettant de gérer la douleur pendant l'intervention et en post-opératoire). Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Nous avons défini les variables analysées et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique (Buprénorphine) ou seront euthanasiés. Ces variables incluent le poids corporel, l'apparence physique, et le comportement avec pour chaque variable une évaluation quantitative. Tout animal auquel aura été attribuée une valeur totale comprise entre trois et quatre recevra des analgésiques (Buprénorphine 0.1 mg/kg par voie SC). Tout animal auquel aura été attribuée une valeur totale supérieure à quatre sera euthanasié immédiatement par dislocation cervicale.

La durée du protocole sera de 4 mois maximum après la chirurgie.

2785- Plus d'un milliard d'individus de par le monde souffrent de maladies inflammatoires chroniques pulmonaires et 4 millions en meurent chaque année. Il n'existe pas actuellement de moyen thérapeutique efficace permettant d'endiguer la progression de ces maladies. De nouvelles molécules sont mises au point actuellement y compris par notre laboratoire pour traiter ces pathologies. Celles que nous développons sont à visée anti-inflammatoire. Nous avons développé un inhibiteur d'enzymes responsables de la dégradation du tissu pulmonaire. Ce projet consiste à le tester in vivo chez le macaque *Cynomolgus*. Pour cela, l'inhibiteur sera administré par voie sous-cutanée chez l'animal après induction d'une inflammation pulmonaire.

REPLACEMENT : Nous avons déjà testé notre inhibiteur in vitro. Il est destiné à être utilisé comme médicament chez l'homme. Il n'existe pas de méthode in vitro permettant de prédire l'efficacité de telle molécule in vivo chez l'homme dans le cas d'inflammation pulmonaire.

REDUCTION : Les résultats que nous observerons ne seront pas soumis à des tests statistiques. Chaque animal sera son propre contrôle. S'il y a une inhibition de l'inflammation lors de l'administration de l'inhibiteur, alors cet effet pourra directement être imputé à celui-ci. C'est pourquoi nous n'utiliserons que 3 animaux et chaque animal sera traité 2 fois.

RAFFINEMENT : Nous avons raffiné nos procédures (prise de sang, aérosolisation et lavages broncho-alvéolaires sous anesthésie). Le système d'élevage ne sera pas modifié et il y aura un enrichissement social (hébergement en groupe, surface suffisante par animal, présence de jouets). Afin d'éviter l'angoisse et la douleur, les animaux seront anesthésiés.

2786- Les canaris ont la particularité de pouvoir apprendre des chants et des mélodies qui sont parfois éloignés des vocalisations habituelles de leur espèce. Cette particularité avait intrigué les philosophes du XVIII^{ème} siècle qui découvraient là qu'un animal était doté de capacités à être éduqué et sensible à la musique. Dès cette époque des auteurs découvrirent de manière empirique que des interactions entre un animal et une machine, conduisaient à des apprentissages. La serinette, fut largement utilisée pour faire chanter ces oiseaux, mais il ne nous reste que peu de témoignage sur l'étendue des apprentissages et les types de mélodies qui étaient réellement apprises. A l'heure où se déploient des recherches sur les interactions entre des animaux et des robots à des fins d'apprentissages, ces travaux anciens retrouvent une actualité. En nous inspirant de ces méthodes nous voulons rechercher l'étendue des capacités des mâles et femelles de canari à apprendre des mélodies et rythmes afin de compléter les connaissances que nous avons acquises par ailleurs grâce aux méthodes actuelles de l'éthologie.

Dès l'éclosion, les canaris seront exposés à des mélodies de serinette. A l'âge de 40 jours, les mâles seront élevés en isolement social et les mélodies de serinette continueront d'être diffusées quotidiennement. A l'âge de 2 mois, un implant de testostérone permettra d'accélérer le développement du chant qui, dans les conditions normales, dure 6 à 8 mois. Ainsi, le chant adulte sera enregistré jusqu'à l'âge de 4 mois maximum, le chant adulte dans ces conditions atteignant sa forme définitive "cristallisée" entre 3 et 4 mois après l'éclosion. Un prélèvement sanguin sera effectué respectivement 1 et 2 mois après la pose de l'implant de testostérone.

Chez les femelles, la préférence pour les mélodies de serinette sera mesurée lorsqu'elles seront adultes. Nous compterons le nombre de postures de sollicitation à l'accouplement ainsi que le nombre de cris de contact produits pendant les diffusions. Respect de la règle des 3Rs:

Remplacer: cette expérience sera réalisée avec des canaris domestiques issus de l'élevage de notre laboratoire. Les oiseaux ne seront pas sacrifiés à la fin de l'expérience: ils pourront éventuellement être réutilisés voire cédés à des tiers.

Réduire: le nombre d'oiseaux utilisés (n= 12 mâles, n= 12 femelles) permettra un traitement statistique fiable des données accumulées. Un contrôle journalier des boxes expérimentaux sera effectué

Raffiner : différentes mesures seront prises pour réduire l'inconfort, la douleur, la peur, le stress et la souffrance au cours de nos expériences. Pendant les phases d'isolement social, un miroir sera placé dans la cage ce qui permet de réduire significativement le stress. Au cours de ces expériences, une caméra installée dans chaque caisson expérimental permettra également un contrôle visuel de l'animal et du bon déroulement de l'expérience sans avoir besoin d'ouvrir la cage. Pour les mâles placés en isolement social, une femelle sera introduite dans la cage de manière hebdomadaire. Pour les femelles, les caissons expérimentaux seront ouverts entre les phases de diffusion permettant un contact acoustique et visuel avec les autres femelles.

2787- Notre laboratoire est leader dans le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux afin de comprendre comment ils agissent et quelle efficacité ils ont sur les cancers colorectaux. Les patients atteints de cancers colorectaux sont généralement traités par chimiothérapie, utilisant le 5-FU comme principal agent anti-cancéreux. Malheureusement une certaine proportion de patients peut acquérir une résistance à ce médicament. Il est donc nécessaire de trouver une autre approche thérapeutique pour ces personnes.

Au laboratoire, nous avons choisi un modèle cellulaire de cancers colorectaux provenant de patients atteints de cancer et nous avons développé à partir de cette lignée dite parentale, un modèle de cellules devenues résistantes à 5-fluorouracile mimant ainsi la résistance observée chez les patients en clinique.

Ces différents modèles cellulaires (sensibles ou résistants au 5-FU) seront injectés à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immunodéficientes, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de

médicament (Aflibercept) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants, les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés, le remplacement est facile à mettre en place, car ces études déjà faites in vitro doivent également être étudiées in vivo, l'environnement d'une tumeur est ici pris en compte. Ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire.

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 94 souris réparties comme suit :

- 84 souris pour le protocole 1

- 10 souris pour le protocole 2

Type d'animaux : Souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 94 souris expérimentales pour une durée maximale de 1 an. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo.

2788- Les maladies autoimmunes (MAI) représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés après les affections cardio-vasculaires et le cancer. Il existe plus de 80 MAI parmi lesquelles les maladies inflammatoires chroniques de l'Intestin (MICI - Maladie de Crohn (MC) et Rectocolite hémorragique (RCH) qui ont des besoins médicaux non satisfaits. En effet, la prise en charge des MICI fait appel à des traitements présentant de nombreux effets indésirables, un fort taux de non-réponses et des taux d'échappements thérapeutiques importants. Ces deux types de pathologies (RCH et MC) sont dus entre autre à un dysfonctionnement du système immunitaire, en particulier contre la flore intestinal, et notamment à une mauvaise régulation des lymphocytes T (LT).

La voie de l'interleukine 7 (IL-7) et de son récepteur (IL-7Ra) a été identifiée comme cible thérapeutique prometteuse dans la littérature chez les modèles de souris conventionnelles et à partir de biocollections cliniques. Des anticorps dirigés contre l'IL7Ra ouvrent donc la voie à de nouvelles biothérapies innovantes, plus sélectives, moins toxiques et à fort potentiel d'efficacité.

Le projet présenté ici consiste à évaluer le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-IL7Ra (développé dans notre laboratoire) dans des modèles précliniques de colites inflammatoires et de Graft Versus Host Disease GVHD chez la souris humanisée (en remplacement des modèles primates), puisque ces anticorps humains ne possèdent pas de réactivité-croisée avec les rongeurs.

Dans cette saisine, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

-Remplacer : Les études in vitro de l'anticorps anti-IL7Ra ont donné des résultats prometteurs quant à un effet biologique de cet anticorps mais limité par l'absence de contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire. Le passage aux modèles in vivo des MICI est indispensable pour valider un effet thérapeutique de cet anticorps. Le modèle souris humanisée représente une alternative solide à l'utilisation pré-clinique de primates.

- Réduire : Puisqu'il n'existe pas d'autres modèles de colite alternatif pour étudier l'efficacité de cet anticorps, les données issues de ce projet devront donc être suffisamment robustes (c'est-à-dire validées avec tests statistiques) pour être utilisées dans les dossiers d'enregistrements des essais cliniques auprès des agences réglementaires. Nous prévoyons donc que chaque groupe de traitement sera constitué de 10 souris, ce qui permettra de réaliser des études statistiques. Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Test de Mann-Whitney) car nous ne pourrions pas nous assurer d'une distribution normale ($n < 30$). Nombre total d'animaux : 420 répartis sur les 3 modèles de colite et les 2 modèles de GVHD (60 souris/modèle avec 6 groupes de 10 souris).

- Raffiner : Les animaux seront suivis quotidiennement lorsque le modèle de colite ou de GVHD sera induit et les signes cliniques notables et sévères décrits dans le tableau en annexe de cette saisine seront notés. Lorsque deux signes cliniques notables seront présents alors il sera administré deux fois par jour une dose de morphinique (buprénorphine 0.05mg/kg en sous cutané), puis lorsque 3 signes cliniques notables ou un seul signe clinique sévère seront notés alors les animaux seront sortis du protocole et euthanasiés. Tous les animaux seront analysés post-mortem avec des prélèvements d'organes en vue

d'études immunohistochimiques ou histologiques permettant de caractériser au mieux le bénéfice du traitement avec l'anticorps anti-IL7Ra.

2789- Nos précédents travaux ont permis d'identifier plusieurs régions et circuits cérébraux critiques. Parmi ceux-ci, le cortex préfrontal (PFC) pourrait sous-tendre plusieurs manifestations pathologiques associées aux troubles anxio-dépressifs, notamment certaines altérations cognitives et comportementales liées à la réponse au stress. Notre projet va donc tenter d'identifier avec précision les substrats anatomiques du PFC associés à 2 fonctions cognitives (la flexibilité cognitive et l'inhibition), en situation de stress (labyrinthe aquatique) et grâce à une méthode d'optogénétique (insertion dans une zone cérébrale d'un gène d'opsine, qui est une protéine sensible à la lumière et capable de contrôler l'activité neuronale). L'objectif de la procédure décrite dans cette saisine est donc de tester l'implication de 2 sous-régions du PFC –cortex prélimbique (PrLC) et cortex infralimbique (ILC)–, à travers le contrôle optogénétique de leur activité neuronale lors de tests de flexibilité et d'inhibition : par une inhibition directe du PrLC (expérience 1) ou du ILC (expérience 2). Notre hypothèse est que le PrLC est recruté lors de tâche de flexibilité cognitive alors que l'ILC est nécessaire pour le test d'inhibition cognitive.

L'opsine qui sera utilisée est un canal ionique, inhibiteur de l'activité neuronale. Elle est inactive dans des conditions normales mais fonctionne uniquement, et de manière transitoire, lorsqu'elle est illuminée par une source lumineuse à une longueur d'onde spécifique. Ainsi, les neurones du PFC qui exprimeront cette opsine auront une activité normale et en tout point similaire aux neurones sans opsine tout au long de la vie des souris. Le seul effet interviendra le jour des tests où une des 2 sous-régions du PFC sera brièvement illuminée (6x5min), ce qui induira une inhibition transitoire et immédiatement réversible de l'activité des neurones exprimant l'opsine (avec un retour à une activité normale dès l'arrêt de l'illumination). Il n'y aura donc aucune perturbation neuronale persistante, lésion ou perte fonctionnelle associées au traitement optogénétique. Le seul effet attendu est une éventuelle modification des performances comportementales lors des tests (seulement si la région illuminée du PFC est impliqué dans ces tâches cognitives).

Les 3 Rs :

Remplacement L'identification précise des circuits cérébraux et l'évaluation comportementale et cognitive du stress peuvent uniquement être réalisées dans des cerveaux entiers et chez des organismes vivants. Il est impossible d'effectuer des recherches de ce type dans des cultures cellulaires, sachant qu'elles ne peuvent reproduire l'organisation complexe d'un cerveau intact. Il n'est bien sûr pas possible d'utiliser des sujets humains pour ce type de projet qui nécessitent de modifier le matériel génétique et l'activité neuronale in vivo à des fins expérimentales. Le choix de l'espèce animale utilisée s'est donc porté sur la souris, mammifère dont les structures cérébrales et les fonctions cognitives présentent suffisamment d'homologie avec l'homme pour modéliser au moins en partie ces fonctions et d'en étudier les mécanismes.

Réduction : Les effectifs sont optimisés et réduits au maximum en tenant compte de la variabilité comportementale inter-individuelle, de celle due aux injections/implantations intra-cérébrales dans des structures fines (de l'ordre du dixième de millimètre) et de la puissance statistique. En outre, nous avons choisi d'utiliser les mêmes individus pour le test de flexibilité et pour le test d'inhibition permettant ainsi de diviser par 2 le nombre de sujets nécessaires pour ce projet (120 au lieu de 240).

Raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (animaux maintenus en grande cages, avec objets, tube, matériel pour nid et abris). D'un point de vue scientifique, l'optogénétique représente une nouvelle méthode de ciblage de populations neuronales peu traumatique, non lésionnelle et spécifique, en comparaison des autres méthodes plus traditionnelles (basées principalement sur des lésions cérébrales, fortement traumatiques pour les tissus et avec des risques élevés de pertes fonctionnelles).

Nombre d'animaux pour toute la durée du projet : 120

2790- L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre comment les cartes visuelles se forment au cours du développement pour assurer une correcte représentation du monde extérieur. Comprendre comment les connexions sont établies et raffinées au cours du développement cérébral est crucial pour appréhender et prévenir les défauts se produisant au cours des pathologies neurodéveloppementales. De plus, l'établissement correct des cartes visuelles étant crucial pour une vision adéquate, les résultats de nos recherches permettront de mieux comprendre les défauts visuels se produisant dans certaines pathologies visuelles ou oculomotrices comme l'albinisme, l'amblyopie, le strabisme et le nystagmus. Ce projet a l'avantage de combiner des approches variées de génétique de la souris, une technique d'électroporation permettant l'expression de molécules d'intérêt dans la rétine ou dans le cerveau avec de la culture cellulaire, du traçage neuronal et des méthodes histologiques pour déterminer le rôle de ces gènes dans la formation et le raffinement des cartes visuelles. Nous avons détecté des défauts de projections visuelles chez certaines lignées mutantes et cherchons à les caractériser plus précisément afin de comprendre le lien entre le gène délété et la conséquence phénotypique sur les projections visuelles et donc la fonction de ce gène.

Nous étudions principalement l'organisation des projections rétiniennes dans le cerveau de souris, qui est trop complexe pour être entièrement modélisé in vitro par culture cellulaire. Afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, nous avons développé la technique d'électroporation (in utero et postnatale) pour marquer les axones rétiniens et également inactiver ou surexprimer des gènes de manière locale et aiguë dans la rétine ou le cerveau chez la souris. Cette technique a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Des travaux précédents nous ont permis de valider les techniques d'inactivation et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Pour ce projet, nous pensons utiliser 1348 animaux (60 adultes, 72 femelles gestantes et 112 portées) répartis entre souris

"normales" (C57BL6), souris avec mutation spontanée (Albino, Tyr-c) et souris transgéniques (Plexine-A1-KO, Sema6D-KO, RIMcDKO). Grâce à cette méthode nous testerons le rôle de différents gènes dans la formation et le raffinement des cartes visuelles.

Nous utiliserons également toutes les techniques nécessaires afin de limiter ou supprimer la douleur au cours de ces procédures par des méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées. Les animaux seront examinés régulièrement pour détecter tout signe de stress et/ou douleur qui pourrait nuire à la santé de l'animal et de ce fait à nos expériences. Des points limites précis ont été élaborés pour arrêter les procédures s'ils sont atteints. Les méthodes d'euthanasie adaptées seront utilisées en fin de procédure.

Les infections sont une des premières causes de mortalité infantile évitable. Dans une étude rétrospective menée sur la population des enfants admis en réanimation pour une infection communautaire sévère les experts ont diagnostiqué un taux de 76% de prise en charge sub-optimale chez les enfants décédés (DIABACT I). Il a été montré également que les soins sub-optimaux étaient significativement plus fréquents chez les enfants décédés que chez les survivants (DIABACT II).

Afin de préciser les déterminants des soins sub-optimaux et d'identifier des pistes d'amélioration, une étude prospective (DIABACT III) a été menée dans 6 CHU du Grand Ouest, incluant, entre août 2009 et décembre 2013, 270 enfants dont 64 infections à pneumocoque.

Dans le cadre d'une infection 3 déterminants sont fondamentaux : l'hôte, l'environnement et la bactérie. Les nombreux éléments de l'évolution de la maladie recueillis au cours de DIABACT 3 sont en cours d'analyse pour déterminer si la prise en charge de l'enfant a été optimale. De même, les prédispositions génétiques des enfants sont aussi étudiées, à la recherche de facteurs de susceptibilité aux infections bactériennes sévères. Enfin, le rôle de la bactérie et de ses facteurs de virulence est aussi en cause dans l'évolution des patients, nous les étudierons dans ce travail.

Dans le monde en 2012 on estime à 1,3 millions le nombre de décès d'enfant imputable aux pneumopathies dont le pneumocoque est le principal agent.

De nombreux travaux ont déjà décrit les mécanismes d'action des facteurs de virulence du pneumocoque lors d'infections invasives, essentiellement sur des souches isolées chez des adultes. Dans ces études l'infection invasive est définie par la présence du pneumocoque dans le LCR ou des hémocultures, sans notion de contexte clinique. On ne retrouve aucune étude dans la littérature étudiant la virulence de souches isolées sur une grande cohorte d'enfants atteints d'une infection invasive sévère comme dans le cadre de DIABACT 3. On sait que les facteurs de virulence de *S. pneumoniae* jouent sur son interaction avec le système immunitaire, notamment en induisant une réponse inflammatoire disproportionnée. Il est prouvé que les différents sérotypes n'ont pas le même potentiel de conduire à une infection invasive, et que l'expression des facteurs de virulences ainsi que la réponse inflammatoire induite varient selon le type de souche. En France en 2012, chez l'enfant de moins de 15 ans les sérotypes 1, 24F, et 12F prédominent dans les infections invasives.

Connaître le sérotype des souches de DIABACT 3 et étudier la réponse inflammatoire qu'elles induisent semble donc une des clés pour comprendre leur virulence.

Afin de limiter la réaction inflammatoire excessive, différentes thérapeutiques anti inflammatoires (corticoïdes, statines, macrolides) sont en cours d'évaluation. En parallèle il a récemment été montré que le linézolide avait des propriétés anti-inflammatoires propres dans les pneumopathies à staphylocoque. Il serait intéressant de l'étudier dans les pneumopathies à pneumocoque, en le comparant aux antibiotiques de référence : l'amoxicilline et la ceftriaxone, afin de déterminer s'il permet de diminuer les lésions pulmonaires par un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire.

Le modèle animal de prédilection pour étudier le pneumocoque est la souris. Il permet d'analyser la survie, la dissémination des souches et la réaction inflammatoire. Cette dernière peut être étudiée via la détermination de marqueurs de gravité pulmonaire : taux de cytokines pro-inflammatoires, mesure de l'activité myéloperoxidase, étude histologique et immunologique, et taux de perméabilité vasculaire. Ces paramètres ont été validés dans plusieurs études de pneumopathies murines à pneumocoque et à staphylocoques.

Objectif principal de l'étude : Caractériser, sur un modèle murin de pneumopathie, les facteurs de virulence de souches de pneumocoque isolées dans un contexte d'infection invasive sévère de l'enfant. Une fois l'infection pulmonaire installée, évaluation de la dissémination des souches bactériennes testées et de la réponse inflammatoire. Enfin, ce travail s'intègre de manière plus générale dans l'étude DIABACT 3 dont l'objectif est d'améliorer la prise en charge des enfants atteints d'infections bactériennes communautaires sévères.

Objectifs secondaires : Evaluer la réponse inflammatoire sous traitement par les antibiotiques par l'étude anatomopathologique de coupes de poumons infectés, par détermination de l'activité myéloperoxidase des polynucléaires neutrophiles, et dosage des cytokines pro-inflammatoires.

Le nombre de souris nécessaires à la réalisation de l'étude est de 1332. Ce sont des Swiss femelles de 6 semaines de vie.

La première partie du travail consistera à déterminer la dose létale 50 et 100% de 2 souches de pneumocoques isolées dans DIABACT III et d'une souche témoin. Durant la seconde partie, pour chaque souche, après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons) avec la dose létale 50%, nous évaluerons 4 groupes : trois en monothérapie (linézolide, amoxicilline et ceftriaxone) et un ne recevant pas de traitement (animaux contrôles). Après l'induction de l'infection, et les traitements par antibiotiques, les poumons et la rate des souris sont prélevés à différents temps afin de réaliser diverses analyses.

Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R. Le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter les sources d'angoisse ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux et des points limites seront mis en place.

En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal est euthanasié (Raffinement). La corrélation in vitro - in vivo n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable (Remplacer).

2791- Il est connu depuis plusieurs décennies que les carences en vitamines B9 (acide folique) et B12 pendant la grossesse peuvent être à l'origine de malformations chez le nouveau-né. Les défauts de formation de la colonne vertébrale (tels que des spina bifida) concernent 1500 bébés chaque année aux Etats-Unis, et entre 1 et 5 nouveau-nés sont affectés pour 10000 naissances en Europe. Depuis les années 2000, de nombreuses études ont montré des corrélations entre les taux de folates et B12 maternels et les capacités d'apprentissage des enfants. Des modèles animaux ont permis de mettre en évidence que l'exposition précoce à une telle carence en vitamines B9 et B12 peut entraîner une altération du développement du cerveau tout comme une augmentation de la survenue de pathologies neurodégénératives.

Depuis les années 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une supplémentation en folates chez les femmes désirant une grossesse (période péri-conceptionnelle) puis pendant le premier trimestre de la grossesse. Ces recommandations ont permis de diminuer le nombre d'anomalies du développement d'environ 30%.

L'étude que nous désirons mettre en place consiste à reproduire ce qui est observé chez la femme enceinte sur un modèle de rat développé et validé au laboratoire et utilisé depuis presque une décennie.

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche in vitro car notre étude porte sur les effets trans-générationnels d'une carence maternelle sur le développement embryo-foetal et la croissance du rat soumis à un régime nutritionnel carencé en vitamines

2. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, à savoir au moins 3 rats mâles et 3 femelles par portée, avec au moins 3 portées par groupe d'étude (témoins et carencés) ; soit 36 descendants auxquels il faut ajouter les 18 mères (dont 12 carencées) et les 9 pères (témoins), permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés. La carence sera maintenue pendant la gestation et l'allaitement jusqu'à 21 jours (moment du sevrage). Notre protocole nécessitera donc au moins 63 rats (27 géniteurs potentiels et 36 descendants) et l'étude va être menée 2 fois consécutivement afin de valider les résultats obtenus et augmenter la force statistique des données. Ainsi, il faudra au total 2x63 rats, i.e. 126 animaux. La carence étant néfaste pour la gestation (60-70% d'échec), cela explique le nombre relativement important de femelles à prévoir pour obtenir un minimum de portées viables indispensables pour mener à bien cette étude.

3. Raffinement : Toutes les procédures expérimentales auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal, et les animaux sont surveillés quotidiennement. Les animaux ne subiront aucun traitement physique ou chimique, hormis le régime nutritionnel dépourvu de vitamines. En dehors des périodes de gestation et d'allaitement, les animaux sont répartis à 2 par cage pour favoriser les interactions sociales chez l'animal.

En fin de protocole les animaux seront mis à mort et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, foie, cœur, colon) pour permettre des analyses biochimiques et histologiques. Les animaux (mères et portées) seront anesthésiés et mis à mort selon la directive 2010-63-UE tandis que les mâles (tous témoins) seront conservés pour d'autres protocoles ou dans le cadre de formations internes.

2792- *S. aureus* est la bactérie la plus fréquemment en cause dans les endocardites infectieuses, et est associé avec les pires pronostics. Les *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) dominant aux USA, mais pas en France, comme dans la plupart des pays européens, où les staphylocoques dorés sensibles à la méticilline (SASM) sont très largement majoritaires. Récemment, il a été rapporté un pronostic aggravé en cas de concentrations minimales inhibitrices de la vancomycine > 1,5 µg/ml y compris sous traitement par β-lactamines chez des souches sensibles à la méticilline. La question de savoir si ce mauvais pronostic est lié à une diminution de l'activité des antibiotiques ou à des modifications de la virulence chez des clones particuliers est encore débattue. La meilleure thérapeutique à mettre en œuvre devant une bactériémie ou une endocardite liée à ce type de souche reste également débattue. Le ceftobiprole, une nouvelle céphalosporine à large spectre qui se lie avec une affinité de haut niveau à la protéine de liaison aux pénicillines de type PLP2a, est extrêmement puissante sur les staphylocoques dorés, qu'ils soient sensibles ou résistants à la méticilline. Dans un précédent travail, le ceftobiprole a montré sa supériorité par rapport à la vancomycine, la daptomycine, et le linézolide, pour le traitement des endocardites expérimentales à *S. aureus* résistant à la méticilline.

Le but de notre étude sera d'évaluer l'efficacité du ceftobiprole dans un modèle expérimental d'endocardite à SASM chez le lapin, selon que la CMI de la vancomycine soit basse ou élevée, en comparaison avec la daptomycine et la céfazoline.

Pour cela, 112 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés. Une endocardite bactérienne à SASM avec CMI basse ou CMI élevée à la vancomycine sera induite. Les animaux seront répartis dans 8 groupes : animaux contrôles (sans traitement), 3 groupes d'animaux infectés par SASM avec CMI basse à la vancomycine traités soit par ceftobiprole, soit par daptomycine, soit par céfazoline, et 3 groupes d'animaux infectés par SASM avec CMI élevée à la vancomycine traités soit par ceftobiprole, soit par daptomycine, soit par céfazoline.

Cinq jours après infection, les animaux seront euthanasiés et les végétations et la rate seront prélevées afin de déterminer les charges bactériennes.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo). Le nombre de lapins a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

2793- Pour évaluer le risque des produits chimiques pour l'homme, des études sont réalisées sur l'animal de laboratoire et soumises aux autorités réglementaires avant leur mise sur le marché.

Les études de toxicologie de la reproduction et du développement concernent les effets potentiels liés :

- à l'exposition prénatale sur une femelle gestante et sa progéniture
- à un effet sur le développement / croissance des animaux juvéniles.

Elles peuvent se classer en différents types:

- Les études de screening réalisées sur un petit nombre d'animaux permettent d'identifier très tôt des effets sur l'équilibre hormonal ou sur le développement de l'animal juvénile. Ces études font suite à des tests in-vitro réalisés sur des cultures de cellules humaines de surrénales (H295R). Si le développement du produit est arrêté, l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux requis par les essais réglementaires est évitée (3R). Par molécule, un maximum de 90 rats sera utilisé.

- Les études chez la femelle gestante (rat ou lapin) sont réalisées pour étudier le potentiel toxique du produit sur la femelle et sur le fœtus tout au long de la gestation, depuis la nidation, la formation de l'embryon et du fœtus, jusqu'à la césarienne. Le laboratoire réalise en appui des tests précoces in-vitro ou chez le poisson « zebra fish » tendant à prédire d'un potentiel tératogène (3R), toutefois l'utilisation de mammifères reste indispensable à une évaluation définitive de l'effet sur le développement de l'embryon et du fœtus. Les études de développement réalisées chez le rongeur ou le lagomorphe (lapin) sont demandées par les autorités et suivent des lignes directrices internationales fixant l'espèce et le nombre d'animaux requis. Une étude préliminaire de choix de doses est d'abord réalisée sur un nombre restreint d'animaux (pour une molécule: 32 par espèce comparée à l'étude définitive 92 par espèce).

- Une série d'études demandées par les autorités réglementaires permet de mettre en évidence des effets très sensibles liés à des perturbateurs endocriniens sur un organisme entier. Elle comprend des essais in-vitro à partir de tissus, des cultures cellulaires issues de glandes endocrines, pour finir par des tests in-vivo à court terme chez les rongeurs mâles et femelles sevrés ou de rat mâle castré.

- l'étude de la sensibilité des animaux juvéniles exposés à un composé ayant une action sur la thyroïde lorsqu'il est administré à la mère pendant la période de gestation et/ou de lactation ou pendant la période de sevrage : étude réalisée à la demande des autorités américaines nécessitant 200 femelles gestantes.

Par an, un total de 1800 rats et 200 lapins seront utilisés (pour l'évaluation d'environ 10 molécules différentes). Les animaux seront hébergés par groupe (en dehors des périodes de gestation) avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites ont été définis par le laboratoire, ils conditionnent l'appel à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'euthanasie précoce de l'animal. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

2794- Au laboratoire, nous avons montré que plusieurs peptides correspondant aux séquences d'interaction entre la tubuline et les filaments intermédiaires ont la propriété de pénétrer dans certaines populations cellulaires spéciales (ciblage). Par exemple le peptide, appelé NFL, est capable de cibler de façon sélective des cellules de glioblastomes humains ou de gliomes murins, dans lesquelles il inhibe la prolifération cellulaire et induit une mort des cellules tumorales par apoptose. Un autre peptide, appelé VIM, est capable de rentrer dans de nombreuses cellules et va cibler le noyau de ces cellules.

Dans le cadre de nos recherches nous avons découvert que le peptide NFL est capable de rentrer préférentiellement dans les cellules souches neurales. Une source potentielle de ce type de cellules réside dans certaines niches neurogéniques du cerveau, et notamment dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), qui borde les ventricules latéraux. Les cellules souches neurales ont la capacité d'auto-renouvellement, une multipotentialité, et des marqueurs cellulaires communs (CD133, Sox2...), ou encore la surexpression de voies de signalisation communes (Notch, EGF...). L'utilisation de telles cellules souches neurales représente un défi thérapeutique très prometteur pour remplacer les cellules nerveuses qui sont lésées ou qui dégèrent dans les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Sclérose en Plaques) et pour lesquelles aucune thérapie efficace n'existe actuellement.

Dans cette optique, le laboratoire souhaite étudier le ciblage des cellules souches neurales par le peptide NFL in vivo dans les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire de rats et de souris jeunes et adultes, ainsi que dans les cellules souches de la moelle épinière. Cette étude in vivo sera effectuée en injectant le peptide dans les ventricules latéraux de rats et de souris jeunes et adultes sains. Nous étudierons également l'utilisation du peptide lié à des nanocapsules lipidiques pour le ciblage des cellules souches neurales. Enfin, nous aborderons l'identification des protéines membranaires permettant le ciblage du peptide à ces cellules.

Les animaux recevront une injection de peptide seul, modifié, ou couplé à des nanoparticules dans le ventricule latéral, de façon stéréotaxique, puis seront sacrifiés différents temps après l'injection, pour analyser le ciblage des cellules souches neurales. Différentes conditions expérimentales seront utilisées et représentent un total de 720 rats et de 720 souris. Ces travaux ont une finalité thérapeutique, à savoir le ciblage des cellules souches neurales dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique. Dans ce cadre, il est essentiel d'avoir une preuve de concept sur au-moins deux modèles petit-animal (de type rongeur) avant de pouvoir lancer des essais sur grands animaux (type singe), et/ou des essais cliniques de phase I ou II. Or, à l'heure actuelle il n'est pas possible de dire qu'un modèle (rat ou souris) est le plus proche de l'homme. Par contre ce sont les deux modèles les plus utilisés dans la communauté scientifique pour ce type d'approche expérimentale.

C'est pourquoi, le projet sera focalisé d'abord sur le modèle rat pour déterminer et valider le plus de paramètres possibles. Puis, nous utiliserons ces informations pour confirmer ensuite que cela se retrouve dans le modèle souris. Cependant, nous

n'utiliserons certainement pas toute l'approche développée pour le rat (et donc le nombre d'animaux sera normalement réduit), sauf s'il s'avère que ces deux modèles sont différents.

Les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives n'impliquant pas d'animaux vivants. De plus, l'ensemble de ces travaux respecte la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE, en remplaçant ou à défaut ici, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. En effet, selon les résultats obtenus pour la cinétique de ciblage du peptide in vivo, tous les temps ne seront pas nécessairement étudiés (réduction). Enfin, comme nous le décrivons dans ce dossier, nous suivons une grille d'évaluation au cas où un animal montrerait une douleur spéciale, nous arrêterions l'expérience pour cet animal (raffinement). Enfin, nous mettons tout en oeuvre pour réduire le plus possible toute forme de douleur, de souffrance ou de stress de l'animal, en utilisant des méthodes anesthésie/analgésique appropriées à la technique de chirurgie utilisée, en suivant l'état général des rats pendant toute l'expérimentation (poils hérissés, pincement de la patte ou de la queue pour évaluer la douleur, ...), et en hébergeant les rats en nombre raisonné dans les cages (3-4 rats par cage), sans enrichissement particulier des cages (à part la présence d'une cabane).

L'ensemble de ces analyses permettra d'évaluer l'efficacité de ciblage du peptide pour les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire.

2795- Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus fréquente mais aussi la forme la plus agressive des cancers cérébraux. Ils surviennent à tout âge mais dans 70% des cas entre 45 et 70 ans, et touchent les hommes et les femmes. Les symptômes, quant à eux, dépendent de la localisation de la zone tumorale ; cela se traduit le plus souvent par des céphalées, déficit focal, crises d'épilepsie, hyper tension intracrânienne, modifications du comportement... La survie moyenne des patients est estimée entre 9 et 15 mois et seulement 3 à 5% des patients survivent plus de 4 ans.

Il a été identifié la séquence d'un peptide composé de 24 acides aminés, dénommé NFL-TBS.40-63, qui est issu d'un filament intermédiaire et qui est capable de fixer la tubuline. Ce peptide a révélé des propriétés anti-tumorales spécifiques au glioblastome :

- Pénétration sélective dans les lignées cellulaires de gliome (faible entrée dans les cellules saines de type neurones ou astrocytes),
- Blocage de la polymérisation des microtubules (pas d'effet dans les cellules saines),
- Inhibition de la division cellulaire (validation in vitro et in vivo après implantation stéréotaxique)
- Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses
- Réduction du volume tumoral chez des animaux porteurs de tumeurs.

La plus grande limite des produits anticancéreux actuels est leur faible spécificité pour les cellules cancéreuses et, en conséquence, le besoin en nouveaux composés anti-cancéreux est élevé. Les données préliminaires sur le peptide NFL-TBS.40-63 sont très prometteuses.

Dans le but de valider l'innocuité de ce peptide innovant, la suite de son développement nécessite la levée d'un verrou technologique à savoir l'évaluation in-vivo de la toxicité propre du peptide, injecté par différentes voies (intra-cérébrale i.c., intraveineuse périphérique i.v.p., et intraveineuse centrale i.v.c.).

Ces études toxicologiques seront réalisées sur des rates Fisher femelles adultes saines, âgées de 7-8 semaines ("Lots animaux").

Les doses de peptide testées seront comprises entre 5 mg/kg et 100 mg/kg. Une première dose faible sera testée (dose 1), puis des doses croissantes (doses 2, 3, 4) dans le but de déterminer la dose maximale tolérée (MTD), la dose létale 50, ainsi que la dose répétée maximale tolérée (MTRD). Ces travaux pré-cliniques sont indispensables pour la mise en place d'essais réglementaires cliniques de phase I ou II chez l'Homme, pour lesquelles il est important de bien connaître le dosage du peptide anti-glioblastome.

20 groupes de rats seront nécessaires par voie d'injection, avec 6 animaux/groupe, soit $20 \times 3 \times 6 = 360$ animaux. Ces travaux seront évalués sur des rats adultes sains femelles, puis selon les résultats devront être réalisés sur des rats adultes sains mâles. Soit $360 \times 2 = 720$ animaux. Ce chiffre est une valeur maximale, puisque selon les résultats obtenus lors d'un protocole, l'ensemble des animaux ne sera pas utilisé. Mais, il est cependant important de démontrer l'innocuité du peptide anti-glioblastome chez les deux sexes, puisque ce traitement vise les hommes et les femmes.

L'ensemble de ces travaux respecte la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE, en remplaçant ou à défaut ici, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. En effet, l'analyse de la toxicité éventuelle du peptide a été effectuée sur plusieurs lignées de cellules autres que des glioblastomes, et nous n'avons pas trouvé de toxicité (remplacement déjà évalué avant d'entreprendre cette étude). Pour compléter l'étude il est indispensable de passer sur un modèle animal avant de pouvoir tester le peptide sur des patients atteints de ce cancer. De plus, si le peptide n'est pas toxique sur les différents lots de rats femelles, nous n'allons pas nécessairement effectuer l'étude similaire sur les animaux mâles (réduction). Les procédures décrites dans cette étude ne devraient pas provoquer de douleur plus forte que la piqure d'une aiguille. Mais, comme nous le décrivons dans la saisine, nous avons mis une grille d'évaluation au cas où un animal ou l'autre montrerait une douleur spéciale, et nous arrêterions l'expérience pour cet animal (raffinement). Enfin, un suivi quotidien du bien-être des animaux est réalisé, et 3 personnes sont impliquées dans ce suivi comme indiqué dans la saisine.

2796- L'utilisation de cellules souches pour la réparation de tissus endommagés représente une des stratégies thérapeutiques entre les plus innovantes. Le muscle squelettique est un tissu modèle pour le développement d'approches correctrices de thérapie cellulaire pour le traitement des maladies génétiques neuromusculaires, sa croissance et sa réparation étant effectuées par une population de cellules souches musculaires appelées cellules satellites.

Chez la souris, l'utilisation de souris transgéniques a permis la mise au point d'une stratégie permettant d'isoler une population pure de cellules souches musculaires (cellules satellites). Des travaux récents montrent que la greffe, dans un muscle de souris dystrophique, d'un très petit nombre de cellules ainsi purifiées produit une régénération musculaire bien plus importante que celle obtenue avec une quantité 10 fois supérieure des mêmes cellules musculaires provenant de cultures cellulaires. Ces résultats indiquent que l'expansion de ces cellules en culture avant la greffe, réduit l'efficacité de transplantation. De plus, des papiers récents montrent que le stress oxydatif joue un rôle clé sur les cellules musculaires en culture, altérant le programme myogénique.

L'ensemble de ces résultats souligne combien la mise au point de conditions de culture pour l'amplification des cellules musculaire est une étape indispensable pour pouvoir envisager des approches thérapeutiques in vivo dans le futur.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement in vivo de cultures de cellules musculaires isolées à partir de souris en le comparant à (1) des cultures primaires de cellules musculaires traitées in vitro avec un puissant anti oxydant, ainsi qu'à (2) des cellules musculaires fraîchement isolées et n'ayant pas été amplifiées en culture qui nous servent de référence. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection. 18 souris immunodéficientes et dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés. L'injection des 2 TA pour chaque souris nous permettra de réduire de 50% le nombre total de souris à utiliser. Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de déceler des signes de douleur. Les animaux qui montrent un signe quelconque de détérioration de leur santé seront euthanasiés.

2797- Les muscles striés squelettiques ont pour fonction la motricité du corps dans son environnement extérieur sous le contrôle volontaire du système nerveux central. L'objectif de ce projet, chez la souris, est d'analyser la régénération du tissu musculaire in vivo pour étudier la physiologie et les déterminants génétiques nécessaires à la fonction des cellules souches musculaires adultes. L'étude de la reconstruction du tissu musculaire de souris génétiquement modifiées permettra de comprendre le rôle de la voie de signalisation Wnt dans la fonction des cellules souches musculaires. Ce projet repose sur l'utilisation de modèles de souris transgéniques obtenus par la stratégie Cre/LoxP inducible par injection de Tamoxifène. Nous utilisons des modèles de souris transgéniques qui ont un système d'inactivation spécifique des gènes cibles uniquement dans les cellules souches musculaires, activé suite à l'induction du système Cre/LoxP. Nous utiliserons 135 animaux par an (405 sur 3 ans). Ce nombre est établi sur la moyenne de l'utilisation de notre laboratoire des 5 dernières années. Nous nous limitons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables pour notre projet scientifique. Lorsque cela est possible, nous remplaçons l'utilisation d'animaux par des expériences in vitro. Chaque expérience est discutée en réunion d'équipe et nous validons le protocole expérimental avant toute expérimentation. Le nombre d'animaux des lots expérimentaux est réduit à la quantité nécessaire et suffisante pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les expérimentations animales sont effectuées sur des animaux âgés de 8 semaines, en accord avec la majorité des études publiées. Les animaux sont observés quotidiennement et leur environnement est enrichi.

2798- La dystrophie myotonique de Steinert ou de type I (DM1) est une maladie génétique dominante qui se manifeste par une faiblesse musculaire, des troubles cardiaques, respiratoires et oculaires de type cataracte. L'évolution de la maladie est progressive et les manifestations sont variables d'un individu à l'autre. La forme la plus grave est la forme congénitale (CDM), les symptômes peuvent apparaître dès la période intra-utérine par une réduction des mouvements foetaux et d'un hydramnios. A la naissance, l'enfant présente une hypotonie généralisée, des troubles de la succion et de la déglutition et souvent des troubles respiratoires. La maladie est due à une anomalie du gène DMPK localisé sur le chromosome 19. La mutation consiste en une expansion du nombre de répétitions du triplet CTG sur le gène allant de 50 à plusieurs milliers de CTG chez les malades au lieu de 5 à 37 chez les individus sains. Le nombre de répétitions est corrélé à la sévérité de la maladie. Notre objectif est d'étudier les anomalies précoces à travers un modèle murin présentant une expansion de plus de 1700 CTG. Les souris homozygotes à étudier notées DMSXL proviennent de croisements entre mâles et femelles hétérozygotes. Ces souris ont une mortalité de 60% dans le premier mois de vie avec un pic la première semaine. L'analyse sera suivie de la naissance à 60 jours de vie. Sur le plan respiratoire, les souris DMSXL font des apnées à un jour de vie (P1) qui persistent à P8-P9.

La partie du projet traité dans cette demande nécessite d'avoir accès à la commande centrale respiratoire afin d'évaluer la part spécifiquement centrale dans la maladie. Les préparations ex vivo présentent l'avantage majeur qu'elles permettent d'accéder directement au réseau respiratoire central sans interférence de composante respiratoire périphérique. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales. Les effectifs visés doivent se situer entre 15 et 20 souriceaux de façon à mettre en oeuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des séries expérimentales. Il y a 3 groupes : sauvage, hétérozygote, homozygote soit 60 souriceaux. La surveillance quotidienne des portées permet de s'assurer du bien-être des animaux. Il s'agit d'identifier les nouveau-nés en souffrance avec un point limite défini par les éléments suivants : coloration bleuâtre, taille/masse inférieure à la moyenne, mise à l'écart systématique du reste de la portée. Les nouveau-nés dont l'observation conduit à identifier ce point limite sont immédiatement mis à mort par décapitation. Généralement, les apnées néonatales quelqu'en soit la nature (obstructive/centrale et/ou mixte) provoquent des séquences d'hypoxie-réoxygénation qui sont considérées comme facteur de risque de désordres neurodéveloppementaux. Notre objectif est de caractériser la nature des

apnées chez les souris DMSXL. Nous regardons également les conséquences tardives de ces apnées sur le plan cognitif par des tests de comportement.

2799- La mémoire est un processus hautement dynamique. La plasticité synaptique est la base cellulaire de l'apprentissage et la mémoire. Nous émettons l'hypothèse que tous ces processus sont contrôlés par l'association et la dissociation de protéines synaptiques. Dans ce contexte, notre travail vise à caractériser les changements d'interactions entre récepteurs et protéines d'échafaudage, pendant l'apprentissage et la mémorisation d'une tâche. Une régulation fine de l'association des protéines en complexes multi-protéiques contrôlerait la transmission synaptique, la plasticité neuronale, l'apprentissage et la mémoire. Ainsi, en mettant en lumière la spécification du rôle des acteurs protéiques de la transmission synaptique et la plasticité cellulaire par leur association en complexes fonctionnels, l'enjeu de cette étude est de modifier ces interactions protéiques pour promouvoir l'encodage de la mémoire et améliorer les performances cognitives. Nous étudierons l'impact de ces phénomènes de remodelage de l'interaction des récepteurs du glutamate avec leurs partenaires (connus comme par ex. les protéines Homer et NR1a, mais aussi des nouveaux partenaires identifiés le long de cette étude) sur l'encodage de la mémoire. Le projet inclut des études comportementales de mémoire non invasives, reconnaissance d'objet, ainsi que l'utilisation d'animaux transgéniques pour suivre les interactions de protéines étiquetées, à l'aide d'une fibre optique implantée dans l'hippocampe des souris.

Nous utiliserons 144 souris pour les expériences de reconnaissance d'objet, un test utilisé pour mesurer la mémoire dépendante de l'hippocampe. Nous nous engageons à suivre la règle de 3R grâce aux mesures suivantes:

Remplacer: Nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations ex vivo (ex. cultures de neurones) avec seul la mise à mort et le minimum de détresse pour l'animal.

Réduire: nous essayerons de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal: i) activité locomotrice; ii) tests de mémoire iii) contenu protéique de régions spécifiques du cerveau (ex. hippocampe).

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

2800- L'enrichissement du milieu est un facteur de bien-être pour les animaux d'expérimentation. Cependant, certains paramètres tels que le poids, le comportement social, l'activité générale, la reproduction, la prise alimentaire et hydrique,... peuvent être affectés par la présence d'enrichissement dans le milieu. Avant de généraliser l'ajout d'enrichissement dans le milieu, nous souhaitons vérifier son impact sur la sensibilisation allergique dans un modèle murin d'allergie au lait.

Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air... En principe, elle est sans danger pour l'homme et se présente sous différentes formes : symptômes digestifs, cutanés, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE se fixent sur un mastocyte, cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, ce dernier est reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte ce qui provoque la libération de son contenu et l'apparition de symptômes cliniques.

Pour cette étude 36 souris Balb/C femelles âgées de 3 semaines seront utilisées et divisées en 2 groupes de 12 souris et 2 groupes de 6 souris. L'enrichissement du milieu se fera en ajoutant dans chaque cage un tunnel en plastique pendant une semaine et la semaine suivant un igloo en plastique afin de limiter l'accoutumance. Deux groupes de 12 souris seront sensibilisées au lactosérum : un groupe sera mis en présence de milieu enrichi et un groupe en milieu non enrichi. Deux groupes de 6 souris serviront de contrôle et ne seront pas sensibilisées : un groupe sera en milieu enrichi et l'autre groupe non. La phase de sensibilisation des souris correspond à une injection intragastrique de lactosérum par semaine pendant 6 semaines. La sensibilisation des animaux sera vérifiée par deux méthodes : un test MSET (équivalent du Prick Test humain) et un test de provocation allergique. Le test MSET consiste en une mesure de l'épaisseur de l'oreille avant et après injection intradermique de lactosérum. Lors de la provocation allergique, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de lactosérum et les signes cliniques d'une allergie (baisse de fréquence respiratoire, baisse de température corporelle, symptômes cliniques) sont suivis pendant une heure. La présence d'IgE sériques dirigées contre le lactosérum est mise en évidence par un test in vitro (ELISA) suite à des prélèvements de sang à différents temps du protocole (J0, J21, J35, J42). L'ensemble de ces tests permettra de confirmer que les souris ont développé une allergie contre le lactosérum et permettra de connaître l'impact de l'enrichissement du milieu sur la production d'IgE fonctionnelles.

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Elles seront maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une hygrométrie de $55 \pm 20\%$. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum.

Il n'existe pas de modèle in vitro qui permette d'évaluer l'effet de l'enrichissement du milieu sur la sensibilisation allergique de souris à un lactosérum (Remplacement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 36 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). A la fin de l'étude ou si l'un des points limites est atteint (affaiblissement, hypothermie irréversible...), les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire (Raffinement).