

**Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques  
Deuxième semestre 2018 (1<sup>er</sup> juillet 2018 au 31 octobre 2018)**

- 8490** Pour toutes les situations dans lesquelles la réparation de grande perte osseuse spontanée est difficile, voire impossible, l'utilisation de transferts osseux vascularisés ou des techniques de transport osseux par système de fixation externe sont proposées aux patients par les chirurgiens orthopédiques. Cependant, souvent longues et contraignantes, ces approches thérapeutiques représentent un enjeu médical et socio-économique majeur. Une de ces solutions thérapeutiques est la technique développée par Masquelet. Elle consiste en la reconstruction d'une perte de substance osseuse importante grâce à un protocole en deux temps opératoires. Le premier temps opératoire consiste à interposer du ciment chirurgical, dans la zone de résection osseuse stabilisée au préalable par un système de fixation (plaque, clou ou fixation externe). Autour de ce ciment se forme progressivement une membrane appelée membrane induite. Le deuxième temps opératoire consiste à retirer le ciment en respectant la membrane induite et à interposer des greffons osseux dans l'enveloppe formée par la membrane. Nos travaux précédents nous ont permis de mettre en évidence un nombre important de cellules type ostéoclastes au sein de la membrane induite. La présence d'ostéoclastes dans la membrane induite pourrait être responsable de l'initiation de la reconstruction osseuse permettant ainsi la reformation rapide de la perte de substance.
- Utilisé en clinique avant la réalisation de la technique de Masquelet, l'acide zolédronique est proposé aux patients afin de limiter la durée de vie des ostéoclastes et de freiner le développement osseux des cancers. Nous souhaitons préciser les effets de cette molécule anti-ostéoclastique sur le processus de régénération osseuse par technique de Masquelet afin de donner des indications concernant les conditions de bonne utilisation de ce médicament avant la réalisation d'une technique de Masquelet.
- Au total soixante rats seront traités par la technique de la membrane induite (MI) dont 24 témoins traités par solution saline, et 36 rats traités par acide zoledronique. A l'heure actuelle le rat est l'espèce de choix pour ce type d'étude. Etant donné l'impossibilité de réaliser ce type d'étude dans un modèle invertébré, notre équipe de recherche a développé un modèle murin rendant possible l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la prise en charge de grande perte de substance osseuse par la technique de Masquelet. La taille de chaque groupe (12 animaux) a été réduite au maximum pour permettre d'obtenir des résultats exploitables et un grand nombre de paramètres sera évalué sur les mêmes animaux. Au cours de cette étude, toute souffrance susceptible d'apparaître sera traitée en amont par l'utilisation d'antalgique adapté. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical, tube en carton offrant une cache) sera mis en place pour favoriser le bien être des animaux.
- 8491** La reproduction chez les caprins a lieu naturellement à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait. La mise à la reproduction hors saison sexuelle est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine). Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs et des ovulations sont actuellement la pratique la plus efficace pour désaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage. Des méthodes alternatives existent, comme la pratique de « l'effet mâle » qui consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres au repos sexuel par leur exposition à des mâles sexuellement actifs. Le développement de cette pratique en élevage est freiné par la forte variabilité des résultats obtenus, notamment dans le cadre de l'insémination animale (IA), qui implique la détection des chaleurs des

chèvres afin de les inséminer au bon moment et d'obtenir une fertilité satisfaisante. Or la détection des chaleurs est chronophage pour les éleveurs.

L'objectif du projet est de mettre au point un nouveau dispositif permettant de valoriser l'identification électronique réglementaire et obligatoire des caprins (boucle RFID) afin d'automatiser la méthode de détection des chaleurs préconisée sur le terrain, dans l'objectif de pratiquer l'IA.

Un total de 44 animaux (40 chèvres adultes en lactation et 4 boucs pubères), de race alpine, seront utilisés.

Remplacement :

L'activité sexuelle du bouc et de la chèvre, l'ovulation et l'expression des chaleurs sont des phénomènes complexes qui ne peuvent pas être étudiés *in vitro*.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été défini de façon à pouvoir évaluer l'efficacité du nouveau dispositif de détection automatisée des chaleurs. Il s'agit d'un groupe de 40 chèvres élevées ensemble et mises à la reproduction par IA au même moment dans la conduite habituelle de l'élevage.

Raffinement :

Les chèvres seront hébergées en groupe, sur une litière paillée, le milieu sera enrichi (pneus suspendus régulièrement remplis de foin, plateformes, brosses). Les chèvres feront l'objet d'une surveillance pendant toute la durée du protocole, en particulier au moment de la traite deux fois par jour. En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. Les prélèvements sanguins seront réalisés par des opérateurs expérimentés (animaliers). Des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, et si nécessaire application d'un baume décongestionnant et cicatrisant).

**8492** Ce projet consiste à développer l'apprentissage des gestes de chirurgie viscérale de base sur le porc. Ces dernières années, l'enseignement pratique de la chirurgie était effectué au bloc opératoire sur des patients.

Lorsque l'on désire apprendre une technique, on regarde faire, puis on fait. On n'est performant qu'après un certain nombre d'interventions. C'est la notion de courbe d'apprentissage. Pendant cette période, il y a malheureusement des risques pour le patient au début de l'apprentissage !!!

Depuis une dizaine d'années, le collège de chirurgie viscérale (chargé de l'enseignement des chirurgiens viscéraux) a basé l'enseignement pratique de la chirurgie viscérale sur la simulation chez l'animal.

La simulation, est une technique d'apprentissage qui sert à remplacer les expériences réelles par des expériences guidées.

Utilisée depuis de très nombreuses années dans l'aviation, elle est actuellement la base essentielle de l'enseignement pratique de la Médecine. En Chirurgie elle repose sur l'utilisation :

1. de simulateurs informatiques, ils sont basés sur le même principe que les simulateurs de vol dans l'aviation, ils sont utilisés au début de l'apprentissage, ils sont très rapidement dépassés, car ils ne reproduisent pas les conditions d'une intervention sur « le vivant »

2. d'une simulation sur l'animal (porc), elle permet de réaliser l'enseignement sur un être vivant endormi avec des risques de complications per-opératoire identiques à ceux rencontrés chez l'homme (hémorragie et/ou lésions d'organes) et de former l'interne à une situation « d'urgence » per-opératoire. C'est la base de cet enseignement pratique !

3. Simulation sur le cadavre, une fois cet enseignement effectué, les internes ont une à deux séances sur le cadavre pour répéter les temps opératoires et poursuivre leur enseignement en salle d'opération sur le patient.

Le nombre restreint de corps rend cette simulation difficile à réaliser.

Principe de notre enseignement par simulation sur le porc : deux internes par animal tour à tour opérateur et aide sous contrôle d'un chirurgien senior enseignant.

Programme de l'enseignement

L'enseignement se déroulera sur trois ans avec trois niveaux de formation

Niveau 1 : formation à la laparotomie (interne de deuxième année)

Niveau 2 : formation à la laparoscopie de base (interne de troisième année)

Niveau 3 : formation à la laparoscopie complexe (interne de quatrième année)

Chaque niveau de formation comprend 3 sessions d'une journée par an.

Arrivée la veille : enseignement théorique et briefing

Le lendemain : simulation sur le porc

Fin de journée : débriefing et départ

Seize internes seront formés par session (2 internes par table d'opération), huit porcs seront utilisés par session.

Prévision du nombre d'internes à former et du nombre de sessions par année à assurer sur 3 ans.

2018 : 48 internes (3 sessions/internes, 16 internes / session) : 9 sessions

2018-2019 : 96 internes (bénéficiant de 3 sessions) : 18 sessions

2019-2020 : 144 internes (bénéficiant de 3 sessions) : 27 sessions

Nombres de porcs nécessaires

Huit porcs de 30 à 40 Kg sont nécessaires par session pour former 16 internes,

Année Universitaire 2018 : 9 sessions à assurer nécessitant 72 porcs (8X9)

Année Universitaire 2018-2019 : 18 sessions à assurer nécessitant 144 porcs (8X18)

Année Universitaire 2019-2020 : 27 sessions à assurer nécessitant 216 porcs (8X27)

Total sur trois ans : 432 porcs en 54 lots (54 sessions).

La Règle des 3R a été prise en compte

1 - Remplacer, Comme nous l'avons déjà dit, on ne peut remplacer ce modèle par un autre modèle (limites des simulateurs informatiques et de l'apprentissage sur le cadavre).

L'utilisation du porc permet surtout de réaliser l'enseignement sur un être vivant endormi avec des risques de complications per-opératoire identiques à ceux rencontrés chez l'homme (hémorragie et/ou lésions d'organes) et de former l'interne à une situation « d'urgence » per-opératoire.

2 - Réduire, le nombre de porc à utiliser a été réduit au maximum :

Utilisation d'un porc pour deux internes qui sont tour à tour aide puis opérateur.

Réalisation d'au moins dix procédures chirurgicales (5 par internes) en une journée au cours des 6 heures de manipulation.

3 - Raffiner, Les interventions se feront sur animal anesthésié et analgésié afin de réduire au maximum l'angoisse et la douleur de l'animal. Le raffinement sera pris en compte, les animaux seront hébergés en boîtes collectives avant les sessions. La veille de l'intervention, ils seront logés en cases individuelles adaptées à l'espèce, aux parois ajourées permettant de sentir et voir les congénères des boîtes voisines dans une salle commune. Le cycle nyctéméral est respecté et la température est constante (23°C +/- 1°C). La ration journalière respecte les apports recommandés pour l'espèce et les signes de mal être seront recherchés.

De plus les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs et du personnel connaissant l'espèce, dans le but de réduire au minimum la souffrance des animaux qui seront sacrifiés en fin de procédure

**8493** Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau d'origine inconnue et non contagieuse, affection dermatologique qui touche 2 à 3 % de la population mondiale, atteignant de manière équivalente les hommes et les femmes. Le psoriasis en plaques, appelé également psoriasis vulgaris, est la forme la plus courante du psoriasis (plus de 90 % des cas). Dans sa forme bénigne et typique, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu ; le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Le traitement est adapté en fonction de la gravité et du retentissement sur la qualité de vie des patients. Les causes précises du psoriasis sont inconnues bien que, dans près de 30 % des cas, une prédisposition familiale existe, surtout si des facteurs externes viennent se rajouter. L'épiderme se renouvelle trop rapidement, en seulement quatre à six jours, au lieu des trois semaines habituelles ce qui engendre des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et forment une couche de

pellicules blanches appelées squames. Parfaitement inoffensives, celles-ci ont pourtant le désavantage d'être inesthétiques.

Le but de ce projet est d'étudier les effets du composé HS230318, composé naturel modifié chimiquement, sur le traitement de psoriasis induit chez la souris BALB/c. Nous utiliserons 48 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour ce projet.

Les 48 souris BALB/c seront réparties en 6 groupes de 8 souris avec 1 groupe sans induction de psoriasis traité avec un véhicule neutre et 5 groupes avec induction de psoriasis traités respectivement avec un véhicule neutre, avec une solution de composé HS230318 à la dose de 5 mg/kg, avec une solution de composé HS230318 à la dose de 15 mg/kg, avec une solution de composé HS230318 à la dose de 50 mg/kg et avec une solution d'Apemilast à la dose de 15 mg/kg, référence pharmaceutique utilisé pour le traitement du psoriasis par voie orale chez l'Homme. Les procédures appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) l'application cutanée pendant 13 jours (J1 à J13) d'une pommade contenant l'agent inducteur de psoriasis ou d'une pommade neutre, c) traitement des animaux par administration orale des différentes solutions testées pendant 7 jours (J7 à J13), d) l'évaluation comportementale de animaux dans un dispositif expérimental appelé open-field ou champ ouvert pendant 10 minutes, 24 heures après le dernier traitement oral (J14) avec enregistrement vidéo pour la quantification de différents paramètres, e) un prélèvement de sang avant à la mise à mort des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J14). Des analyses de prélèvements cutanés effectués sur l'ensemble des animaux seront également réalisées. Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant l'évaluation comportementale de composés (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre minimum d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle de psoriasis et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20% du poids maximum atteint au cours l'étude, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du psoriasis dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

**8494** La borréliose de Lyme est une maladie transmise par une tique dure du genre *Ixodes* (*I. ricinus* en Europe) et causée par une bactérie appartenant au phylum des spirochètes : *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Le réservoir naturel de la maladie est représenté par les petits rongeurs et certains oiseaux. Une interaction entre le pathogène, le vecteur et l'hôte est nécessaire pour la persistance de la maladie dans la nature. Chez l'Homme, impasse bactériologique pour le pathogène, de nombreuses manifestations cliniques sont décrites selon le stade de la maladie mais ce sont des formes cliniques tardives qui posent un véritable problème diagnostique et thérapeutique.

L'objectif de l'étude est de démontrer la persistance de la bactérie dans les infections disséminées de la peau et leur réactivation possible par une immunosuppression locale à l'aide d'un corticoïde. Cette caractérisation de la bactérie permettra de développer une nouvelle méthode diagnostique chez l'Homme basée sur des biopsies cutanées.

L'imagerie en bioluminescence permet d'accéder de façon non-invasive et en temps réel aux mesures d'activités biologiques fonctionnelles *in vivo* en utilisant des marqueurs non-radioactifs sur des rongeurs. Elle repose sur la détection de la lumière émise par les cellules suite à une réaction chimique avec la luciférase (enzyme) et la luciférine (protéine substrat). Les souris seront donc d'abord infectées à la seringue en intradermique avec des bactéries *Borrelia* marquées à la luciférase. Plusieurs protocoles de réactivation de la bactérie seront réalisés après 40 jours : localement avec 3

types de dermocorticoïde ou par un corticoïde pris par voie générale. La réactivation de *Borrelia* sera suivie longitudinalement par imagerie en bioluminescence après l'administration des corticostéroïdes. Ainsi pour ce projet, 50 souris au total réparties en 2 sessions d'imagerie seront étudiées par imagerie en bioluminescence. A chaque session, 5 groupes composés chacun de 5 souris infectées : un groupe contrôle, un groupe par type de dermocorticoïde (par puissance croissante : hydrocortisone, bétaméthasone et clobétasol) et un groupe traité avec de la cortisone, seront imagés.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3R :

- Remplacement : Le modèle est infectieux. Il n'est pas possible de travailler sur des organes isolés pour deux raisons principales : i) le but de l'étude est d'analyser la dissémination du pathogène dans différents organes à partir d'une inoculation intradermique ; ii) l'imagerie doit être effectuée sur animal entier. Un modèle complet est donc nécessaire à cette étude.
- Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités par la cortisone par voie générale afin de limiter leur inconfort et ils seront traités si des douleurs apparaissent (paracétamol en cas de nécessité voire sacrifice). Ils ont également à disposition des enrichissements dans leur cage et restent hébergés en groupe.
- Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse statistique est un test non paramétrique de Man-Whitney.

**8495** De petites molécules, appelées métabolites, dérivées de la flore intestinale ont été associées au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de la flore intestinale. L'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale a été testé sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris ou le rat. Les résultats ont montré plus précisément le rôle d'un de ces métabolites, et que ce dernier aurait un impact sur une protéine spécifique. Les objectifs seront donc de préciser le rôle de la protéine cible par l'utilisation d'un modèle murin dans lequel cette dernière est surexprimée après supplémentation avec notre métabolite d'intérêt. Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R (réduire, remplacer, raffiner) et du bien-être des animaux. L'amélioration de l'environnement d'hébergement se fera grâce à un enrichissement. Nous nous limiterons au plus petit nombre possible d'animaux permettant l'obtention de résultats exploitables d'un point de vue statistique. Nous utiliserons 40 souris. Il n'est pas possible de "remplacer" l'étude *in vivo* visant à analyser les effets multi-organes induits par le métabolite d'intérêt par une étude *in vitro*. Le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations *in vivo* chez l'animal entier. Les souris seront surveillées de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux.

**8496** Une perturbation de la balance entre excitation (neurones glutamatergiques) et inhibition (neurones GABAergiques) dans le cerveau est à l'origine de maladies neurodéveloppementales associées à un retard mental comme le syndrome de Down (SD), mais aussi à l'apparition de maladies neurologiques telles que la schizophrénie et l'épilepsie.

La présence en 3 copies d'un gène candidat sur le chromosome 21 entraîne chez les souris les mêmes déficits neurologiques que chez les personnes trisomiques. De plus, la perte de fonction de ce gène entraîne un syndrome de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie et des comportements autistiques.

Nous proposons d'analyser le rôle de ce gène dans les neurones GABAergiques afin de comprendre l'impact de cette molécule sur les déficits neurologiques observés dans les deux syndromes. Pour ce projet, nous utiliserons le modèle souris car ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant proche de l'être humain.

Pour cette étude, nous utiliserons les modèles suivants :

-Ts1Yey, trisomique (modèle SD)

-Ts1Yey;Dlx6aCre/+ dans lequel une copie du gène a été inactivée dans les neurones GABAergiques, permettant le retour à deux copies de ce gène dans ces neurones (sauvetage des déficits cognitifs observés dans le SD)

-Dlx6aCre/+ : perte d'une copie du gène dans les neurones GABAergiques

Une série de tests de comportement portant sur les phénotypes observés dans le SD et le MRD7 (hyperactivité, mémoire, sociabilité) peu voire non-invasifs seront réalisés espacés d'environ une semaine, le premier test commençant vers l'âge de 12-13 semaines. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront sacrifiés car inaptes à une étude comportementale.

A la fin des tests comportementaux, les souris bénéficieront d'un enregistrement électroencéphalographique (EEG) couplé à la vidéo pour tester et évaluer leur susceptibilité aux crises épileptiques spontanées et des crises induites par une substance pro-convulsivante, le pentylène tétrazole (PTZ). Les animaux seront sacrifiés directement à la fin de ce protocole. Ces expériences nécessiteront 175 souris au maximum.

**8497** La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle utilisée en routine en oncologie générale. Son intérêt est grandissant dans la prise en charge des tumeurs cérébrales, tant d'un point de vue diagnostique, que du suivi thérapeutique. L'arrivée de nouveaux radiotraceurs plus adaptés à la neuro-oncologie, notamment les traceurs des acides aminés, ne fait qu'accroître son intérêt dans cette indication. Le RANO (the Response Assessment in Neuro-Oncology) recommande depuis 2017 l'usage de l'imagerie TEP par des acides aminés radiomarqués en complément de l'IRM conventionnel. En effet, les capacités diagnostiques de l'IRM sont limitées et ne permettent pas de prédire efficacement l'agressivité et l'hétérogénéité tumorale impactant sur le diagnostic et le traitement de ces pathologies.

La tumeur cérébrale la plus agressive et présentant l'espérance de vie la plus faible est le glioblastome (Gliome de grade IV). Cette tumeur de haut grade, présente de nombreux types et sous types caractérisés par des mutations génétiques différentes (classification OMS, 2016), impactant directement le pronostic de ces tumeurs.

Parmi ces mutations, la mutation IDH1 est la plus connue et la plus étudiée. Il a été démontré que les patients porteurs de cette mutation possèdent un meilleur pronostic avec une amélioration significative de la réponse aux traitements par chimiothérapie. Il est donc indispensable de mieux connaître les profils de fixations de nos radiotraceurs dans les tumeurs cérébrales IDH1 mutées ou non mutées, afin de développer l'imagerie TEP dans la prise en charge de ces gliomes. Les résultats de cette étude permettront d'apporter aux cliniciens un outil d'intérêt prédictifs, c'est-à-dire décisionnels sur le plan thérapeutique du patient.

Ce projet a pour objectif de caractériser en imagerie TEP le glioblastome par des radiotraceurs du métabolisme (18F-FDG, 18F-FDopa, 11C-méthionine) et de l'inflammation (18F-DPA714) et également par un traceur de l'angiogenèse (68Ga-NODAGA-RGD) après greffe intracérébrale chez le rat ; en étudiant particulièrement l'impact de la mutation IDH1.

Pour cette étude d'imagerie, il sera réalisé une greffe intracérébrale chez 40 rats nus, repartis en 2 groupes selon le profil génétique IDH1 :

-20 rats avec une greffe d'une lignée cellulaire de glioblastome non muté pour le gène IDH1

-20 rats avec une greffe d'une lignée cellulaire de glioblastome muté pour le gène IDH1

Chaque groupe de rats passera un examen IRM morphologique (maximum 1/semaine) pour déterminer le volume de la tumeur jusqu'à atteindre la taille cible (25mm<sup>3</sup>) avant les examens TEP. Le statut IDH1 du glioblastome sera également confirmé par spectroscopie à résonance magnétique.

Dans ce cas d'étude, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives est impossible puisque l'utilité même d'un radiotraceur est de permettre un suivi *in vivo*. Le potentiel diagnostique des 5 radiotraceurs sera évalué sur le même animal, ce qui permettra de diminuer considérablement le nombre d'animaux (Réduction). De même, l'IRM permettra de s'assurer que la taille cible de la tumeur est atteinte afin de ne pas inclure d'animaux non exploitables dans le protocole (Réduction). Enfin, en conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi

quotidien, les rats seront anesthésiés pour l'ensemble des procédures (implantation de la tumeur, imagerie IRM/TEP), et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

**8498** Les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces et évoluent vers des thérapies de plus en plus ciblées et personnalisées afin d'augmenter leur efficacité et réduire les effets secondaires. Néanmoins, l'efficacité de ces traitements reste encore insuffisante et le développement de modèles précliniques prédictifs et hautement caractérisés représente un enjeu majeur pour développer et/ou optimiser des thérapies anticancéreuses efficaces et adaptées à chaque type de cancer voir à une sous-population ciblée de patients. Il est désormais communément admis que les modèles de xénogreffe de tumeurs de patients (PDX), qui consistent à greffer chez la souris immunodéficiente un fragment de tumeur humaine, sans manipulation *in vitro*, reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. Ces modèles sont également très intéressants car ils permettent de conserver et d'amplifier du tissu tumoral humain, par exemple pour des expériences *in vitro*, ce qui est très important dans le cas de pathologies rares.

Ce projet se focalise sur des tumeurs rares de l'ovaire présentes chez des patientes atteintes d'un syndrome neurologique paranéoplasique (SNP). Cette pathologie est due à une réponse auto-immune dirigée contre un antigène neuronal dont l'expression est partagée par les cellules tumorales. Ces tumeurs sont caractérisées par une forte infiltration par les cellules immunitaires (T et B) et par une évolution lente, suggérant un contrôle efficace par le système immunitaire. Ces modèles, une fois reconstitués avec un système immunitaire humain, représentent donc des outils de choix pour étudier les mécanismes d'immunosurveillance des tumeurs chez l'homme. Le projet vise à constituer une collection de PDX de tumeurs SNP de l'ovaire et de les exploiter pour évaluer l'efficacité antitumorale de la réponse immunitaire chez ces patients et étudier les capacités intrinsèques de ces tumeurs à recruter les effecteurs de l'immunité, comparativement à des tumeurs contrôles.

Des fragments de tumeurs ovariennes, obtenus dans le respect de la réglementation en vigueur (consentement éclairé, sérologie, anonymat) grâce à une collaboration étroite avec le centre de référence des SNP et les services de chirurgie et d'anatomopathologie, seront greffés à des souris immunodéficientes. Une fois le modèle stabilisé par greffes successives de fragments tumoraux (passages), des cellules immunitaires autologues (i.e. du même patient) ou hétérologue (d'un autre donneur) seront injectées afin de reconstituer un système immunitaire humain.

Ce projet permettra de mieux comprendre comment une tumeur est contrôlée par le système immunitaire et d'identifier les mécanismes permettant à ces tumeurs de recruter les effecteurs de l'immunité. Ces connaissances devraient permettre à terme de développer de nouvelles stratégies pour réactiver le système immunitaire chez les patients conventionnels (non SNP).

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. Une définition précise des points limites, l'administration d'analgésique en pré- et post-opératoire et une surveillance adaptée des animaux permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Il est prévu de collecter 5 tumeurs de patients sur 5 ans. Pour générer un modèle PDX pour chaque patient et effectuer les expériences proposées, nous estimons avoir besoin de 360 souris sur une durée de 5 ans.

**8499** Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs sous-cutanées chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Nous développons de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie ayant pour but de restaurer l'activité du système immunitaire et permettant ainsi un arrêt de la progression tumorale / l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées sur l'utilisation de composés innovants ciblant une molécule impliquée dans l'échappement immunitaire tumoral. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de service, recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques, avec un nombre de 10 études par an, comprenant 50 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 2500 souris).

Nous proposons donc d'évaluer dans notre activité de service, les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins syngéniques bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés

sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris immunocompétentes. Les tumeurs sont des modèles intégrés qui font intervenir de nombreux types cellulaires et de fonctions de l'organisme. Afin d'évaluer le bénéfice d'un traitement il est indispensable de travailler sur un modèle animal.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés *in vitro* par le client, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 10 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au maximum au respect de leur bien-être (utilisation d'antidouleurs quand c'est nécessaire, nursing pendant et après les actes contraignants (maintien de la température corporelle par exemple) et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

**8500** Dans le cadre d'un consortium international, 250 lignées de souris génétiquement modifiées ont été générées, afin de déterminer la fonction de gènes et leur implication dans des maladies. Le but étant de mettre à la disposition de la communauté scientifique des connaissances, des lignées et des données scientifiques afin de ne pas multiplier inutilement les travaux sur l'animal.

Toutes ces lignées sont modifiées génétiquement de la même manière, mais en ciblant chacune un gène différent. Initialement les animaux porteurs de cette modification génétique expriment le gène normalement, comme un animal non modifié. Une injection de tamoxifène, va entraîner une modification génétique et donc une inactivation du gène.

Ce projet vise à analyser 13 lignées pour vérifier que l'inactivation du gène suite à l'administration de tamoxifène fonctionne correctement.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante :

(1) Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à la collection de plusieurs organes chez le même animal. Ainsi, pour les 13 lignées, un maximum de 208 souris sera utilisé.

(2) Raffinement : Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son sacrifice. Le point d'injection sera vérifié 2 fois par jour.

(3) Remplacement : Ce projet implique l'administration de tamoxifène qui va agir sur l'ensemble des systèmes ne pouvant pas être réalisé sur un modèle cellulaire.

**8501** L'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) conduit fréquemment à la perte de neurones du cortex moteur qui forment le faisceau corticospinal (FCS), structure clé dans le contrôle du mouvement volontaire. L'AVC est de fait la première cause de handicap acquis à l'âge adulte, et un enjeu majeur de la santé publique. Les thérapies existantes reposent majoritairement sur l'augmentation de la plasticité cérébrale. Toutefois, l'efficacité limitée des traitements pharmacologiques et de la rééducation motrice soulignent la nécessité de développer des stratégies innovantes pour améliorer la régénération tissulaire après une lésion du cortex moteur.

Afin de mimer les effets délétères d'un AVC ischémique sur l'intégrité du cortex moteur et du FCS, nous avons mis au point un modèle basé sur l'injection ciblée d'une toxine qui crée une lésion au niveau du cortex moteur primaire. Cela nous permettra d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique à base de bioimplants sur la récupération motrice chez l'animal. Le cœur du projet vise à créer une technologie générique pour améliorer la réparation tissulaire après une atteinte dans le système nerveux central. L'idée principale de ce travail est la mise au point d'un système implantable dans le cerveau, dont le but est de régénérer des fibres d'un faisceau corticospinal endommagé. L'objectif est de mettre à profit les potentialités régénératrices (neurogenèse) des cellules souches du cerveau adulte, en fournissant au sein de la lésion, un support structuré qui crée un environnement



plus permissif à la survie de cellules souches. Concrètement, nous implanterons au niveau de la lésion des biomatériaux en polymère pour espérer recréer des fibres motrices fonctionnelles. Dans l'espoir d'augmenter encore la régénération tissulaire, nous cultiverons sur les implants des cellules souches qui s'ajouteraient à la neurogenèse endogène pour recréer des fibres motrices. Pour se rapprocher de la pratique clinique, nous privilégions l'examen de l'intégrité du tissu cérébral par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) *in vivo*. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive, et est indispensable pour suivre la dégénérescence des tissus lésés, déterminer le volume lésionnel, et suivre l'effet bénéfique potentiel d'une greffe sur l'architecture tissulaire. Les animaux seront évalués pré-lésion, à 24h, 8 jours, 1 mois et 3 mois. Ils seront anesthésiés pendant toute la durée de l'examen pour assurer leur immobilité et éviter un stress inutile. A la fin du suivi comportemental et d'imagerie, les animaux seront mis à mort et le tissu cérébral sera analysé par histologie. L'analyse caractérisera la perte de neurones et de fibres myélinisées, l'inflammation, et en particulier la nature du tissu reconstruit autour des implants. Dans le cadre d'une implantation de biomatériaux + cellules souches, la survie et la formation de nouveaux neurones sera analysée.

Le bénéfice de notre stratégie thérapeutique par greffe de biomatériaux (avec ou sans cellules souches) sur la récupération fonctionnelle de la motricité doit être évaluée sur des animaux vivants. La force d'agrippement, la dextérité, et la motricité des animaux seront testés sur le long terme grâce à des tests appropriés, sur des animaux entraînés.

Le modèle utilisé est un primate du nouveau monde, le marmouset. Il présente des avantages indispensables par rapport aux rongeurs, du fait de sa proximité avec l'Homme en termes d'anatomie des structures motrices et de dextérité des membres supérieurs.

En accord avec la règle « Réduire » des 3Rs, les données d'IRM de protocoles précédents seront exploitées. Nous prévoyons 36 animaux sur 5 ans.

Les marmousets sont hébergés en couple ou en groupe, et peuvent communiquer visuellement et auditivement avec les autres animaux de la salle. Ils ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, y compris pendant les phases d'entraînement et d'évaluation moteurs. Le suivi de l'état de santé général de l'animal est assuré par le personnel de zootechnie, les animaux sont pesés mensuellement et bénéficient de contrôles vétérinaires réguliers. Une attention minutieuse est apportée aux animaux opérés, les marmousets sont monitorés quotidiennement par le personnel de zootechnie et les expérimentateurs munis de l'habilitation à l'expérimentation animale niveau Concepteur (observation de l'appétit, du poids corporel, de la mobilité, de l'état du pelage et du comportement).

**8502** Les chimiothérapies antimétaboliques utilisées dans la clinique comme traitement contre le cancer aujourd'hui ont comme désavantage d'avoir des effets secondaires très sévères. Ces chimiothérapies sont non-seulement actives au niveau de la tumeur mais dans tous les organes du corps. Ceci explique les effets secondaires non-désirables qui peuvent être mortels chez les patients. Les Photostatines (PSTs) constituent une nouvelle classe d'agents antimétaboliques qui ont la particularité de pouvoir agir contre les cellules cancéreuses de façon spécifique grâce à une activation par une lumière bleue au niveau de la tumeur. Ces molécules sont inactives sans lumière/dans le noir et montrent 250 fois plus de toxicité envers les cellules cancéreuses après une courte exposition à la lumière bleue. Cette observation *in vitro* (dans plus de 10 lignées cellulaires) ainsi qu'une première expérience *in vivo* a démontré le potentiel thérapeutique des PSTs pour un nouveau type de thérapie ciblée. Cette nouvelle thérapie pourrait avoir des effets-secondaires très réduits en comparaison avec les chimiothérapies antimétaboliques utilisées dans la clinique. Les PSTs (déjà brevetées) ont été publiées dans la revue Cell et ont reçu divers supports financiers de recherche ainsi que pour leur développement préclinique comme nouveaux agents ciblés contre différentes tumeurs.

Ces nouvelles études auront pour but de montrer l'effet anti-angiogénique des PSTs, l'angiogénèse jouant un rôle clé dans la progression tumorale.

Dans un premier modèle animal, l'angiogénèse sera induite au sein d'une éponge de cellulose implantée en sous-cutanée chez la souris. Le facteur de croissance FGF2 sera injecté dans l'éponge pour promouvoir l'angiogénèse. L'objectif est de démontrer que les PSTs peuvent diminuer l'angiogénèse, seulement quand l'illumination bleue est présente. Les PSTs seront également injectées dans l'éponge. En fonction des groupes d'étude, une illumination sera appliquée sur

l'éponge pour activer les PSTs. Cette illumination proviendra soit d'une LED fixée sur le dos de la souris, soit d'un système exogène. Un groupe contrôle positif sera constitué d'éponges imbibées avec du FGF2 seul. Les contrôles négatifs seront constitués d'un groupe dont les éponges seront imbibées avec du PBS et d'un groupe dont les éponges seront imbibées avec un mélange FGF2 et PSTs, mais qui sera gardé à l'obscurité.

La quantité d'hémoglobine des éponges, reflétant l'angiogenèse, sera dosée.

Une deuxième étude portera sur un modèle murin de cancer du sein. Des cellules cancéreuses, exprimant la luciférase, sont implantées au niveau de la mamelle chez des souris immunodéprimées. Les PSTs seront injectées (par voie intraveineuse), à deux doses distinctes, et illuminées avec des LEDs fixées sur la souris. Le contrôle positif sera constitué d'un groupe injecté en intraveineuse avec un agent chimique qui perturbe l'angiogenèse, la combretastatine. Les contrôles négatifs, seront constitués d'un groupe injecté avec du PBS et d'un groupe injecté avec des PSTs mais gardé à l'obscurité. L'action des PSTs sera évalué par : un suivi de la croissance de la tumeur primaire au pied à coulisse, une imagerie de bioluminescence de la tumeur primaire, ainsi qu'un suivi de l'apparition des métastases (visibles également par imagerie de bioluminescence).

Ces deux études impliqueront 70 souris.

Remplacer :

A ce stade du projet, tous les tests *in vitro* ont été effectués, il est indispensable d'intégrer le fait que l'angiogenèse et les cellules cancéreuses se développent dans un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine.

Réduire :

L'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Toutes les souris seront utilisées, sachant qu'une tumeur qui ne se développe pas constitue quand même une information scientifique qui sera prise en compte. Les nombres de souris indiqués par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable, évitant de refaire l'expérience

Raffiner :

Nous utiliserons des souris immunodéprimées, qui représentent un modèle proche de la physiopathologie humaine, et permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. La croissance des tumeurs n'entraîne pas de gêne (ni la présence du disque de cellulose) et sera suivie régulièrement au pied à coulisse et par imagerie de bioluminescence. La gravité des procédures est légère pour l'étude sur disque de cellulose. Elle sera modérée pour l'étude sur tumeurs orthotopiques. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**8503** Les lésions traumatiques de la moelle épinière, aboutissant à la mise en place irréversible d'une paralysie et d'une perte de sensibilité au niveau des membres, demeure un problème majeur d'incidence stable pour laquelle il n'existe toujours pas de traitement. Les conséquences d'une lésion médullaire sont donc souvent dramatiques et définitives. Une hypothèse sérieuse pour expliquer la gravité des lésions et l'absence de récupération est une extension de la lésion dans les heures qui suivent le traumatisme et dans un deuxième temps la mise en place d'un tissu cicatriciel qui empêche la réparation des fibres nerveuses lésées.

La toxine Botulique de type A (BoNT/A), produite par la bactérie *Clostridium botulinum*, est bien connue en thérapeutique. Elle possède une action relaxante au niveau des muscles, ainsi que des effets anti-inflammatoires et antalgiques (contre la douleur) propres. Une partie des effets de la BoNT/A s'exerce au niveau du système nerveux central et en particulier au niveau de la moelle épinière. Notre équipe a contribué à une série d'expériences ayant permis de montrer l'innocuité d'administrer la toxine au niveau de la moelle épinière chez l'animal (pas de modification de l'état général et du comportement). Les propriétés anti-inflammatoires et anti-douleurs de la BoNT/A nous indiquent que son utilisation puisse être bénéfique dans le traitement des lésions de la moelle

épineière. Notre objectif principal est par conséquent d'évaluer le potentiel thérapeutique de la BoNT/A dans le contexte des lésions de la moelle épinière chez la souris. En particulier nous souhaitons déterminer si une injection locale de la toxine permet de réduire la taille de la lésion et de favoriser la récupération locomotrice.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Le choix de la mise en place du projet au laboratoire est le fruit d'un travail préparatoire qui a consisté à réunir l'ensemble des moyens matériels et l'expertise nécessaire à sa bonne réalisation. En regard de la nature des phénomènes que nous souhaitons suivre au cours du temps, du manque d'outils non invasifs nécessaires à l'exploration de ces mêmes phénomènes chez l'homme, et finalement du manque de connaissances et donc d'outils de modélisation pour l'étude des phénomènes traumatiques au niveau central, notre projet ne peut s'abstenir de l'utilisation du modèle animal. Dans ce contexte, le choix de la souris comme modèle expérimental repose sur le fait qu'il permette de mimer la physiopathologie humaine. Au cours des deux années, nous utiliserons 30 souris au total, chaque groupe expérimental (témoin et BoNT/A) étant constitué d'une dizaine d'animaux pour des raisons purement statistiques. Néanmoins, dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet et dans les projets à venir, nous constituerons une banque de tissu afin d'anticiper d'éventuelles analyses immunohistochimiques et biochimiques complémentaires. Le projet a été bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Nos protocoles incluent des mesures prophylactiques et l'utilisation d'une pharmacologie adaptée permettant de prévenir la manifestation de douleur. Des points limites spécifiques, établis dans le respect du bien-être animal et n'entravant pas les objectifs de l'expérience, ont été clairement fixés.

**8504** Les infections par certaines *Escherichia coli* pathogènes sont un enjeu majeur de santé publique. En effet, certaines de ces bactéries appelées Shiga-Toxin *E. coli* (STEC) ont la capacité de produire des toxines, appelées shiga-toxines (Stx), qui entraînent des diarrhées hémorragiques qui peuvent s'aggraver par des dommages au niveau des endothéliums vasculaires des reins et du cerveau. Ces lésions provoquent un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) à l'origine d'insuffisantes rénales qui peut conduire à la mort du patient infecté. Le traitement des patients infectés par les STEC est compliqué. En effet, l'utilisation d'antibiotiques est limitée car ces molécules induisent un relargage massif de toxines Stx aggravant le pronostic clinique du patient. D'autre part, aucun traitement curatif contre l'activité de ces toxines n'existe à l'heure actuelle. En revanche, des composés chimiques capables d'inhiber sélectivement le transport des toxines bactériennes dans les cellules de l'hôte ont été développés. La preuve de concept de l'efficacité *in vivo* (chez la souris) de 2 molécules pour traiter les infections à STEC a été établie et publiée récemment et l'utilisation de ces composés, dits inhibiteurs du rétrotransport, ainsi que des dérivés optimisés a été brevetée.

Cependant, bien qu'avérée, l'efficacité de ces composés inhibiteurs du rétrotransport n'est pas totale, ce qui pourrait limiter son utilisation en clinique pour prévenir l'apparition du SHU.

L'objectif de ce projet est double :

- De nouvelles molécules plus actives et agissant sur d'autres voies de transport des toxines ont été développées à partir des composés inhibiteurs parentaux. Nous testerons si ces inhibiteurs améliorés augmentent la protection contre l'infection et préviennent l'apparition du SHU.

- Des données récentes de la littérature nous amènent à penser que l'efficacité des composés inhibiteurs du rétrotransport dépend de la forme sous laquelle les toxines sont produites. En effet les bactéries ont la capacité de produire des vésicules extracellulaires (VEs) qui peuvent contenir et séquestrer des toxines. Il a été montré notamment que la toxine Stx, sécrétée par les STEC, est produite à la fois sous forme libre (70%) et sous forme encapsulée dans des VEs (30%). Nous proposons d'évaluer l'impact de la forme sous laquelle la toxine Stx est présente lors de l'infection dans le développement du SHU et dans la réponse au traitement par les nouveaux composés inhibiteurs.

Les infections à STEC, la production et la libération des toxines Stx libres et encapsulées ainsi que la mise en place du SHU sont des phénomènes complexes faisant intervenir des facteurs bactériens, environnementaux ainsi qu'une réponse de différents types cellulaires de l'hôte (comme l'altération de la fonction de barrière des cellules intestinales ou des tissus vasculaires ou la réponse

immunitaire). Ils ne peuvent être correctement modélisés *in vitro*. Le recours à un modèle animal, ici la souris, est indispensable. Le modèle consiste à infecter oralement des souris d'une part avec des souches STEC produisant ou non des VEs contenant la toxine Stx et d'autre part avec des VE purifiées, puis à traiter ces animaux avec les composés inhibiteurs du rétrotransport. Un suivi clinique des animaux est ensuite réalisé pendant 10 jours. Cette étude a pour objectif ultime d'engager le développement industriel d'un médicament alternatif aux antibiotiques dont l'utilisation est limitée contre les STEC et le SHU, par un transfert de technologie vers une société pharmaceutique.

La règle des 3R est respectée :

Remplacer : De nombreuses études utilisant des cellules de mammifères en culture ont permis d'élucider comment agissent les toxines produites par les bactéries. Cependant, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun autre modèle ne permet d'évaluer, au niveau d'un individu, les répercussions d'une infection bactérienne ou de la production de toxines sur la flore intestinale et sur l'organisme infecté.

Réduire : Des expériences préalablement réalisées avec ce modèle permettent d'estimer de manière optimale le nombre d'animaux requis. Ce projet nécessite l'utilisation de 765 souris âgées de 6 semaines. Plusieurs paramètres seront analysés et suivis dans le temps sur le même animal vivant (poids, score clinique, nombre de bactéries, prélèvements de fèces) et lors du sacrifice (appareil digestif, nœuds lymphatiques mésentériques, foie, poumons, rate et sang).

Raffiner : Les souris sont hébergées dans des conditions d'hygrométrie et température constantes. Les cages possèdent des cabanes dans lesquelles les animaux peuvent se cacher et exprimer un comportement propre à leur espèce. Les cages sont teintées de manière à apaiser les animaux. Le change de la cage et de la litière est effectué toutes les semaines. La surveillance quotidienne permet de veiller à une hydratation et une alimentation *ad libitum*.

Des problèmes respiratoires, des tremblements, pli de peau persistant, poils ébouriffés, absence de toilettage, un état de prostration et/ou une perte de poids supérieure à 20 % du poids initial nous conduiront à sortir l'animal du protocole expérimental et à le sacrifier.

**8505** Les motoneurones se trouvent dans la moelle épinière où ils contrôlent les mouvements volontaires et la respiration grâce à l'innervation des muscles impliqués. Dans la sclérose amyotrophique latérale (SLA), les motoneurones dégénèrent et les patients atteints manifestent des troubles moteurs. Cette maladie est progressive et la durée de vie de malades est en général inférieure à 5 ans une fois le diagnostic établi. La mort survient par étouffement suite à la perte de l'innervation du diaphragme. A ce jour, il n'existe pas de traitement pour cette pathologie. En plus de la lourde souffrance pour les patients et leurs proches, le coût de prise en charge pour la santé publique est important. Ce projet vise à déterminer si les motoneurones de la moelle épinière peuvent être protégés contre la neurodégénérescence. Des résultats préliminaires suggèrent qu'une molécule endogène de la moelle épinière est importante pour la survie des motoneurones.

Dans un premier temps nous développerons et optimiserons l'apport exogène de la molécule par voie intrathécale et/ou intramusculaire en l'injectant dans le muscle de souris type sauvage sous anesthésie légère. La molécule internalisée par les terminaisons des motoneurones au niveau du muscle est transportée vers les corps cellulaires dans la moelle épinière. Ces deux approches élimineront l'injection dans la moelle épinière, intervention chirurgicale lourde et douloureuse.

Dans un deuxième temps, nous utiliserons ces méthodes afin de traiter des souris génétiquement modifiées qui expriment moins la molécule. Ces souris existent déjà, sont disponibles et ne présentent aucun phénotype immédiatement visible, au moins jusqu'à 15 mois. Néanmoins, l'analyse histologique montre une perte progressive des motoneurones. Nous comparerons des souris traitées ou non avec la molécule livrée par voie intramusculaire ou par voie intrathécale en suivant la mort des motoneurones et en effectuant des tests de motricité. Nous espérons que la molécule sera capable de protéger les motoneurones contre la dégénérescence et éviter les déficits moteurs.

Nous testerons l'hypothèse selon laquelle l'action neuroprotectrice de la molécule requiert son passage entre les interneurones qui la fabriquent et les motoneurones. Pour cela nous induirons l'expression d'un anticorps contre la molécule par transfection spécifiquement et précisément dans la partie ventrale de la moelle épinière où se trouvent les interneurones motoneurones. Si l'hypothèse est juste, bloquer le passage de la molécule devrait induire une dégénérescence des motoneurones.

Aussi, nous déterminerons s'il existe une interaction génétique entre le gène encodant la molécule et des gènes associés avec des formes familiales de la SLA. Nous nous attendons à observer un phénotype aggravé.

Nous prévoyons l'utilisation de moins de 545 souris pour ce projet. Nous avons utilisé la variabilité et les différences publiées dans la littérature en termes de motricité et nombre de motoneurones afin de réduire le nombre des souris nécessaires par condition, par groupe et par âge tout en conservant une puissance statistique suffisante.

Ce projet vise à déterminer si En1 exogène est capable de fournir la neuroprotection des motoneurones qui meurent chez les patients atteints de SLA. Nous utiliserons des souris car les conditions des expériences *in vitro* ne présentent pas le contexte tridimensionnel et physiologique nécessaire. De plus, suivre un comportement moteur exige l'utilisation des mammifères vivants. Le nombre des souris proposé tient compte d'une réplication indépendante des deux protocoles de neuroprotection. En développant une voie d'administration par injection intramusculaire et une autre par injection intrathécale, nous éviterons l'administration dans la moelle épinière qui requiert une intervention chirurgicale lourde et douloureuse.

Les souris seront légèrement anesthésiées afin de minimiser leur angoisse et leur souffrance. En cas de douleur après l'injection nous administrerons un analgésique par voie systémique.

En ce qui concerne le bien-être des animaux, les souris seront hébergées ensemble pour leur fournir une vie sociale et dans des conditions d'enrichissement de leur environnement. Les souris seront observées chaque jour pendant cinq jours après injection intramusculaire ou intrathécale, puis chaque semaine afin de détecter tout signe de douleur. En cas de souffrance observée selon la grille d'évaluation de la douleur les souris seront traitées avec un analgésique. Si la limite de cette grille est atteinte les souris seront sacrifiées selon la procédure approuvée.

**8506** La malnutrition désigne un état pathologique causé par la carence (sous-nutrition) ou l'excès d'un ou de plusieurs nutriments (surnutrition). Elle peut être provoquée par un apport alimentaire insuffisant, un déséquilibre de la balance nutritive, une altération de la digestion ou une mal absorption des nutriments.

La sous-nutrition n'est pas simplement provoquée par une carence alimentaire mais résulte également d'une interaction complexe « environnement-hôte » et est souvent associée à un changement significatif dans la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et de sa fonctionnalité. Le microbiote intestinal peut être modulé par plusieurs facteurs comme dans le cas d'utilisation de certains médicaments, de nutriments ou même de bactéries lactiques de type lactobacilles (gram positives).

Des résultats obtenus au laboratoire, ont permis de mettre en évidence un rôle bénéfique de certaines souches de lactobacilles sur la promotion de la croissance, sur des larves de drosophiles et chez des souris monoxéniques (dont le microbiote intestinal est réduit à une unique souche bactérienne) mises sous carence nutritionnelle. Récemment des données préliminaires, ont montré des effets bénéfiques de la souche de *Lactobacillus plantarum* WJL (*L. plantarum* WJL) sur la restauration du retard de croissance chez des souris juvéniles en statut conventionnel. De plus, il a été montré que l'administration de *L. plantarum* WJL modifie l'équilibre redox de l'hôte, en ayant un effet direct sur la voie de signalisation IGF1/Insuline.

Le but de ce projet sera d'identifier l'effet du probiotique *L. plantarum* WJL sur le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans la restauration du retard de croissance.

L'utilisation d'animaux est essentielle, en effet les interactions entre le microbiote et l'hôte ne peuvent pas être étudiées *in vitro*. Le nombre d'animaux sera utilisé à minima, permettant une exploitation statistique des résultats, en respectant leur bien-être.

Les procédures répondront aussi à ces exigences avec, en plus, la mise en place de points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleurs de l'animal. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié. La procédure inclue, un prélèvement de sang terminal réalisé sous anesthésie générale afin d'éviter toutes souffrances inutiles.

Ce projet concernera au maximum 240 souris.

**8507** L'objectif de ce projet est d'étudier l'altération de la locomotion caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) associées à des mutations des gènes SMCR8 et C9ORF72. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide qui est caractérisée par une dégénération des motoneurons de la colonne vertébrale conduisant à une paralysie progressive fatale. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurons de la moelle épinière, qui sont responsables des mouvements. La compréhension de la fonction de ces gènes mutés nous permettra de mieux comprendre, voire de traiter, ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de paralysie moteur déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris que nous développons présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique modèle de cette maladie. Nous espérons que ces animaux développeront une paralysie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes à l'origine de cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver une thérapie pour cette maladie.

Raffinement :

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

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses et que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 120 souris réparties en cinq groupes et deux types d'injections (intracérébrales ou intraveineux). Plus en détails, nous prévoyons pour chaque type d'injection 12 souris contrôles, 12 souris avec une expression de SMCR8 normal, 12 souris avec une expression de SMCR8 muté, 12 souris avec une expression de C9ORF72 normal et 12 souris avec une expression de C9ORF72 muté. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés après la mort des animaux pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

**8508** Le cancer de la peau de type non-mélanome est la forme de cancer la plus répandue dans le monde et particulièrement chez les populations adultes à peau claire. Le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre l'apparition de ce cancer non mélanome reste un enjeu sociétal mondial, le nombre de cas détectés par an étant en constante augmentation. Parmi les facteurs de risques majeurs impliqués dans le développement de ce cancer, on retrouve les rayons ultraviolets (UV) et l'infection par les papillomavirus humains cutanés (HPV). De plus, Les personnes immunodéprimées sont très sensibles à ce type de cancer de la peau, soulignant l'importance du système immunitaire dans la protection contre ce type de cancer.

Cette étude a pour but d'approfondir les connaissances sur les mécanismes synergiques de ces deux facteurs environnementaux, l'irradiation UV et l'expression de protéines impliquées dans l'oncogenèse par le virus HPV, dans le développement de la carcinogenèse de la peau. Pour cela, un modèle de souris transgéniques (Tg) exprimant de manière constitutive les onco-protéines du virus HPV sera utilisé et permettra d'étudier : les réponses du système immunitaire avant et après exposition aux UVs en particulier la modulation de l'inflammasome par HPV. Dans ce projet spécifique, nous étudierons :

- 1-*In vivo*, l'impact d'une exposition courte aux UVs sur une voie de l'immunité innée (inflammasome)
- 2-*In vivo*, le rôle d'une protéine particulière (p53) dans la modulation des réponses immunes aux UV
- 3-*In vivo*, le rôle des oncoprotéines dans la modulation des réponses immunes par p53

Il est prévu que les résultats obtenus faciliteront l'élaboration de stratégies préventives et / ou thérapeutiques contre le cancer non mélanome.

Le projet nécessitera l'utilisation de 341 souris. Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe et dynamique, faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. Le recours aux animaux est réduit par des expériences préliminaires *in vitro* dans des kératinocytes primaires humains. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

**8509** Le cancer du rein est la cause de plus de 140.00 décès par an. L'incidence et la prévalence augmentent. Le principal type de cancer du rein est le carcinome rénal (RCC). Dans le cas d'un RCC métastatique, la survie à 5 ans est inférieure à 10% chez l'homme.

Le RCC étant résistant aux chimiothérapies standards, les traitements classiques sont la chirurgie ainsi que des agents antiangiogéniques ou immunothérapeutiques. Ces thérapies ont des réponses variables, et, sans biomarqueurs moléculaires utilisables en clinique, une prédiction précise de l'évolution de la maladie, de l'issue du patient, et de l'efficacité du traitement est difficile.

La physiopathologie du RCC est toujours très peu connue, et il y a un besoin clair d'identifier des mécanismes clés de la progression tumorale et métastatique afin d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Dans des travaux précédents, nous avons identifiés des gènes dont l'expression est dérégulée dans des cellules tumorales murines issues de tumeurs primaire et de métastases, et dont l'expression corrélait avec la survie des patients humains. Dans le but de comprendre les rôles de ces cibles et de mettre en évidence leurs intérêts thérapeutiques potentiels, nous générons des cellules tumorales surexprimant ces gènes et souhaitons analyser leurs rôles dans un modèle *in vivo* murin. Les travaux précédents étant basés sur le même modèle murin, nous pouvons utiliser notre recul pour limiter le nombre d'animaux utilisés sans compromettre la fiabilité statistique de nos résultats. Le projet se place dans le cadre d'un projet de plus vaste faisant intervenir des bioinformaticiens, des mathématiciens et des biologistes.

Afin de mener à bien ce projet, nous tablons sur l'utilisation de 1000 animaux (souris) sur 4 ans. Le recul que nous avons sur notre modèle nous permet de tableur sur une utilisation moyenne de 60 animaux par tranches de 3 mois, ce qui permet aux tumeurs de se développer, et nous permet d'effectuer les analyses de l'expérience en aval. Afin de limiter le nombre d'animaux, les expériences menées seront construites afin de pouvoir recueillir le maximum de données et d'échantillons biologiques. C'est la raison pour laquelle nous recueillerons par exemple le sang, les tumeurs et autres organes d'intérêt (poumons, reins sains), lors du sacrifice des animaux. De plus, les animaux sont suivis de façon journalière par le personnel de l'animalerie ainsi que par les membres de l'équipe scientifique en charge du projet. Les animaux sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée est enrichi par des tunnels en polycarbonate ou polysulfone. La prise en charge de la douleur chez les animaux pendant l'opération est assurée par des antalgiques contenus dans l'anesthésique (xylazine/kétamine). La douleur post-opératoire est prise en charge par une injection de buprénorphine lors de l'opération, soutenue par une seconde injection dans les 48h suivant l'opération si des signes de douleur sont décelés.

**8510** Des modifications du microbiote intestinal ou dysbioses ont été observés chez des sujets obèses ou atteints de stéatose hépatique (NAFLD ou NASH). Certaines souches probiotiques (lactobacilles et bifidobactéries) sont capables de protéger des souris contre une obésité induite par la consommation d'un régime hypercalorique, entraînant non seulement une limitation de la prise de poids, du développement de l'insulino-résistance, mais également de la simple stéatose hépatique. Les effets sont néanmoins souche-spécifiques.

Le programme de recherche vise à évaluer l'impact potentiellement bénéfique de bactéries probiotiques et/ou commensales ou de prébiotiques (composants pouvant agir sur les batéries du

microbiote) ou de symbiotiques (association de pré- et de probiotiques) dans le développement de la stéatose hépatique non alcoolique (maladie du foie gras ou NAFLD) ou NASH en utilisant des modèles pouvant conduire, en présence ou absence d'obésité, au développement d'atteintes hépatiques retrouvées dans les différents stades de la NAFLD/NASH, afin d'évaluer l'impact direct des probiotiques sur le foie et en décrypter les mécanismes d'action.

Nous testerons l'effet de différentes souches, mélanges de souches, de prébiotiques ou de symbiotiques dans différents modèles de souris soumises à différentes conditions nutritionnelles par l'administration de différents régimes spéciaux induisant de l'obésité et/ou du diabète et le développement d'une stéatose hépatique et de NASH : régime MCDD ou régime CDAA/ sucres ou par un traitement chimique par du CCL4, pendant plusieurs semaines à des souris C57BL/6 mâles. Seules les combinaisons probiotiques ou prébiotiques ayant préalablement été démontrées *in vitro* comme possédant des propriétés anti-inflammatoires et/ou capables de limiter la perméabilité intestinale et/ou d'induire la sécrétion de peptides entéro-endocrines, critères pouvant avoir un impact dans le développement de la NASH, seront testés dans nos modèles expérimentaux ('Réduction'). Par ailleurs, notre étude vise à élucider les mécanismes d'action des probiotiques/prébiotiques dans le développement de pathologies métaboliques ; processus physiopathologiques mettant en jeu de nombreux tissus et organes ainsi que divers types cellulaires. Ceci impose donc le choix d'approches expérimentales *in vivo* et *ex vivo* chez la souris ('Remplacement'). Nous suivons notamment l'impact des traitements sur la perméabilité intestinale.

Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique évalué à 1080 souris C57BL/6 type sauvage sur 4 ans. Les mâles seront utilisés dans nos expériences car ils sont plus sensibles métaboliquement au régime riche en graisses induisant l'obésité et le développement de la NASH.

Chaque expérience sera réalisée sur un nombre maximal de 15 souris mâles C57BL/6 par groupe et comprendra un maximum de 6 groupes (soit : 90 souris par expérience, 270 souris par an (3 expériences/an) ; soit un total de 1080 souris sur 4 ans). Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (3 à 4 souris par cage ; présence de petite maison pour améliorer leur bien-être). Les expériences seront arrêtées au maximum à 16<sup>ème</sup> semaine dès qu'une atteinte hépatique peut être observée (NAFLD, fibrose), en suivant notamment régulièrement les taux plasmatiques de transaminases ASAT et ALAT ('Raffinement').

Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

- perte de poids de 20% pour les souris minces déterminée après pesée des animaux et pour une souris obèse perte de poids correspondante au maximum à 20% de perte de poids d'une souris mince correspondante (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau)
- apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.)
- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)
- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie profonde.

**8511** Staphylococcus aureus (Le Staphylocoque doré) représente un enjeu de santé public par sa grande diversité d'infections, sa gravité, sa fréquence mais également en raison de l'émergence régulière de nouvelles souches virulentes. En effet, ces souches présentant une virulence accrue représentent une nouvelle menace en termes de pathogénicité, traitement et prévention de la transmission.

S. aureus dispose de nombreux facteurs de virulence pour infecter son hôte. Parmi ces facteurs, certains sont responsables d'infections communautaires et nosocomiales. Pour chacune des étapes clés conduisant à l'infection (colonisation, invasion, pénétration et diffusion dans les tissus), S. aureus a développé des systèmes permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

Deux toxines de S. aureus ciblent un récepteur humain pour lyser les cellules immunitaires. Pour étudier le rôle de ces deux toxines chez l'animal, une souris humanisée pour ce récepteur a été développée. Dans des modèles de bactériémie (préalablement validés par le comité), cette souris humanisée est plus sensible à l'infection par S.aureus.



Le but de ce protocole est de tester le rôle des toxines dans la virulence de *S.aureus* dans un modèle d'infection cutanée à *S.aureus*. En effet, la peau est le site le plus fréquemment infecté par *S.aureus*. Ce protocole est calqué sur un protocole préalablement validé par le comité sur le rôle des protéines Tir de *S.aureus* dans l'infection cutanée. Pour cela, le protocole prévoit l'utilisation de 60 souris C57Bl/6 ou humanisées. Pour chaque procédure expérimentale, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats interprétables. Pour prévenir et limiter la douleur, les animaux seront sous analgésiques 3 jours avant et pour la durée de l'expérimentation. Toutes les procédures se feront sous anesthésie gazeuse et les animaux seront surveillés quotidiennement pendant la durée de l'expérimentation. L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation du présent projet qui a pour but de valider la pertinence de nos résultats *in vivo* et la souris reste un modèle adapté aux types de recherches envisagées qui s'inscrivent dans un contexte physiologique. Lors des procédures expérimentales, les points limites adaptés aux modèles sont définis et les animaux surveillés quotidiennement.

**8512** La présence de caillots dans les prélèvements sanguins est un problème fréquemment rencontré en biologie médicale chez de nombreuses espèces animales domestiques et de laboratoire. La souris est une espèce particulièrement sensible au phénomène d'agrégation plaquettaire et la présence de caillots dans les spécimens sanguins est un problème récurrent dans les laboratoires. Diverses molécules anti-agrégantes ont été étudiées chez l'homme et chez l'animal et parmi elles, les prostaglandines se sont révélées prometteuses pour empêcher ou limiter la formation d'agrégats plaquettaires *in vitro*.

Dans le cadre d'une étude visant au raffinement d'une procédure (remplacement d'un myélogramme terminal par une prise de sang non terminale) chez la souris greffée avec des cellules cancéreuses humaines, nous avons été confrontés aux difficultés liées à la formation de nombreux caillots et agrégats plaquettaires dans les spécimens sanguins. Il nous a donc paru essentiel de standardiser les conditions d'obtention d'un échantillon sanguin de qualité sur la souris avant de les appliquer aux souris greffées en application de deux des trois principes des 3Rs : la réduction et le raffinement, le remplacement étant impossible dans ce cas.

En s'inspirant des résultats obtenus chez le chat concernant l'action de l'Iloprost sur l'agrégation plaquettaire *in vitro*, l'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet de l'Iloprost sur l'agrégation plaquettaire dans le sang total lors d'un prélèvement terminal à la veine cave caudale chez 20 souris des deux sexes. Les animaux seront hébergés en animalerie agréée, au moins 5 jours avant la procédure expérimentale, afin de permettre l'acclimatation des souris et réduire le stress généré par le transport. En accord avec la règle des 3Rs et dans un souci de raffinement, les animaux seront anesthésiés pendant toute la procédure (anesthésie générale gazeuse à l'isoflurane) et seront sacrifiés, également sous anesthésie générale sans réveil préalable, compte tenu du volume de sang prélevé, incompatible avec le réveil; toutes les précautions seront prises afin de limiter au maximum l'anxiété des animaux, de leur hébergement à leur anesthésie et cette dernière sera l'assurance de l'absence totale de douleur liée aux prélèvements.

L'optimisation et la standardisation des prélèvements sanguins chez la souris constitue une bonne pratique de laboratoire qui permettra à terme d'éviter de futures expérimentations inutiles et donc de réduire le nombre d'animaux.

**8513** Ce projet s'inscrit dans une démarche de formation continue. Cette formation est un stage de 3 jours, destiné aux chercheurs, ingénieurs, et scientifiques, ayant déjà des connaissances de base dans la biologie animale pour comprendre la physiologie de développement de la souris et la technique biologique pour la caractérisation des embryons de souris.

Il est effectivement important de comprendre que beaucoup des modèles de souris qui sont génétiquement modifiées et utilisées pour la recherche en biomédecine montrent souvent une létalité embryonnaire (c'est-à-dire qu'il est impossible de donner naissance à des souriceaux) ou une létalité périnatale. Les grands projets de recherche internationaux auxquels l'institut participe, révèlent qu'environ 30 à 40% des invalidations de gènes entraînent à l'état homozygote (2 allèles du même gène) la mort des foetus in utéro ou durant la période périnatale. Il convient donc de déterminer la

fenêtre de temps durant laquelle la mort survient, d'en identifier la cause et de recenser l'ensemble des anomalies du développement relevant de la mutation.

Le phénotypage d'embryons et de fœtus mutants de souris permet de fournir des informations précieuses sur : 1) la fonction des gènes 2) les mécanismes pathogéniques des anomalies congénitales qui représentent la première cause de mortalité infantile dans les pays industrialisés. Beaucoup de chercheurs ne savent pas comment mener à bien ce type d'analyse.

Nous proposons une formation dédiée au phénotypage de souris porteuses de mutation létale in utero ou au moment de la naissance et dont la fonction du gène muté est à priori inconnue. Cette formation vise à fournir une connaissance théorique et pratique. Elle sera dispensée en anglais, d'où le titre anglophone de ce stage. 10 stagiaires sont attendus.

Pour l'ensemble des enseignements pratiques nous utiliserons

10 femelles gestantes (stade 8.5 jours postcoïtum)

10 femelles gestantes (stade 10.5 jours postcoïtum)

1 femelle gestante (stade 14.5 jours postcoïtum)

5 femelles gestantes (stade 18.5 jours postcoïtum)- stade périnatal

1-Les animaux seront utilisés pour visualiser le développement embryonnaire grâce à un échographe à haute fréquence. Ce test est non invasif et nécessite une anesthésie de la souris gestante. L'utilisation de l'échographe permettra de montrer aux stagiaires comment éviter le sacrifice des mères non gestantes pour les études de développement précoce et comment faire le suivi du développement embryonnaire sans dommages pour la mère et les fœtus ou embryons. En finalité, cela permet de détecter des anomalies de développement et d'estimer la viabilité des embryons ou fœtus en observant les battements cardiaques à partir de 9.5 jours postcoïtum.

2-Les animaux seront aussi utilisés, après sacrifice, pour apprendre le prélèvement des embryons et du placenta, et pour apprendre comment procéder à la fixation, à la réalisation des coupes histologiques et des colorations et enfin à leur analyse pour identifier, l'ensemble des anomalies du développement.

Au total, un maximum de 26 souris gestantes seront utilisées pour chaque stage de formation, tous les 18 mois soit un total de 78 souris sur toute la durée du projet.

**8514** Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité de cette classe d'âge. Le virus respiratoire syncytial (VRS) humain est l'agent principal des bronchiolites du nourrisson, dont la sévérité engendre un risque accru de développer de l'asthme en grandissant. Obtenir un traitement efficace contre ces infections est une priorité de l'OMS.

L'infection VRS a pour particularité de causer des atteintes sévères des voies respiratoires inférieures chez le nouveau-né, alors que chez l'adulte elle est généralement asymptomatique et cantonnée aux voies respiratoires supérieures. Cette sensibilité du jeune à une infection VRS est liée aux caractéristiques de la muqueuse pulmonaire en période néonatale, en particulier à la mise en place de l'immunité et de la colonisation du poumon par différentes bactéries non pathogènes constituant le microbiote pulmonaire. De récentes publications démontrent en effet l'existence de bactéries commensales présentes naturellement dans le poumon. L'impact du microbiote respiratoire sur le poumon et la santé commence à être décrit, notamment dans le cadre de pathologie comme l'asthme. Notre hypothèse est que les bactéries commensales primo-colonisatrices du poumon participent à la maturation et l'orientation des défenses immunitaires pulmonaires du nouveau-né. Nous avons démontré les effets bénéfiques de l'administration d'une de ces bactéries primo-colonisatrices du poumon sur l'asthme, pathologie très similaire à la bronchiolite. Nous proposons dans ce projet d'administrer en période néonatale (souriceaux BALB/c, lignée de référence pour étudier l'infection VRS) des souches bactériennes primo-colonisatrices isolées du poumon pour orienter la réponse immunitaire de la muqueuse pulmonaire vers une immunité protectrice contre l'infection VRS.

Le souriceau est un modèle de choix pour caractériser les réponses immunitaires néonatales contre le VRS, et étudier les mécanismes de défenses antivirales pour au moins deux raisons : 1/ le souriceau de moins de 7 jours présente des caractéristiques immunologiques très proches de celles d'un bébé de 2 mois ; 2/ le VRS peut se répliquer dans les poumons des souris sans les rendre

cliniquement malades et permet ainsi l'étude des réponses inflammatoire et immunitaire dans cet organe.

La première partie du projet a pour objectif de caractériser l'impact de souches primo-colonisatrices sur des poumons de souriceaux afin d'identifier les bactéries candidates aux propriétés anti-VRS, par la mise en œuvre de co-culture de bactéries avec des explants de poumons, ou d'approches *ex vivo* pour réduire le nombre d'animaux.

La deuxième partie du projet permettra de faire la preuve de concept que l'administration *in vivo* d'une ou d'un cocktail de souches primo-colonisatrices du poumon limite la réplication virale et la sévérité des infections VRS, et de définir une ou un ensemble de bactéries (cocktail bactérien) au potentiel anti-bronchiolite pour un usage thérapeutique

Enfin, la troisième partie du projet aura pour objectif de définir un cocktail bactérien au potentiel anti-bronchiolite pour un usage probiotique en définissant sa forme et sa dose d'administration ainsi que l'effet de la lyophilisation sur son efficacité.

Notre finalité est de concevoir un produit bactérien à l'action bénéfique anti-VRS capable de diminuer la réplication du virus et de limiter la sévérité des atteintes immuno-pathologiques liées à l'infection. Cette solution présente l'avantage d'utiliser des bactéries commensales non pathogènes primo-colonisatrices au tropisme naturel pour les poumons. Le développement d'un traitement préventif anti-bronchiolite utilisant des bactéries primo-colonisatrices du poumon est une approche innovante pour atténuer la sensibilité des nouveau-nés au VRS et pour prévenir le développement d'une forme sévère de la maladie. Son action protectrice sur la muqueuse respiratoire limiterait aussi le risque de développer de l'asthme.

Le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet qui s'étalera sur une période de 5 ans intégrant une étude cellulaire et moléculaire de la réponse immunitaire modulée potentiellement par 20 souches bactériennes, et nécessitera au maximum 2520 souris (nouveau-nés et adultes). Le nombre d'animaux dans une expérience répond à des besoins statistiques pour attester d'une différence biologique et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins. Il faut  $n \geq 12$  souriceaux et  $n \geq 6$  adultes par groupe expérimental. Le nombre supérieur de souriceau est justifié par la nécessité de pooler les organes lorsque les quantités de cellules/organes sont trop faibles pour permettre la réalisation de toutes les analyses. De plus les expériences doivent être répétées de façon indépendante pour valider une hypothèse.

Les souriceaux sont élevés avec leur mère (2 mères/cage) pour réduire leur stress lors de la manipulation des souriceaux jusqu'au sevrage. Des mouchoirs sont mis à disposition des mères pour nidifier. L'infection VRS n'entraînant pas de perte de poids chez le souriceau, les animaux ne sont pas pesés. La présence des souriceaux dans le nid ainsi que la bonne prise alimentaire (l'estomac des souriceaux est bien blanc suite à la prise de lait) est observées tous les jours par les animaliers. Nous estimons que les niveaux de douleur/stress sont légers pour l'étape d'infection des souriceaux. Pour réduire le niveau de douleur, nous endormons les souriceaux par le froid. Si l'aspect général (apparence, taille) du souriceau régresse par rapport au reste de la fratrie, l'animal sera sacrifié (point limite). Chez la souris adulte, l'infection VRS n'entraîne ni dégradation du comportement de l'animal (pas de prostration, alimentation normale), ni de signes cliniques visibles (bonne apparence du pelage, pas de problème respiratoire) hormis une légère perte de poids post-infection inférieure à 10% du poids de la souris, et la souris récupère très vite. Le suivi et la pesée quotidienne des souris permettront de déterminer l'état pathologique de l'animal. Si la perte de poids dépassait 20% alors les animaux seraient sacrifiés (point limite).

**8515** Dans les stations expérimentales productrices d'animaux, il est nécessaire de toujours mieux caractériser les animaux avant leur sélection pour des programmes de recherche, ceci afin de garantir la validité des données produites. Par exemple, il est nécessaire de connaître les groupes sanguins, les formules sanguines et de réaliser des caryotypes pour vérifier que les animaux ne sont pas porteur d'anomalies chromosomiques, ... il s'agit d'un phénotypage fin.

Toutes ces analyses sont réalisées à partir d'une prise de sang sur les reproducteurs (mâles et femelles) et sur les porcelets.

Dans notre élevage porcin, nous effectuons les prélèvements suivants :

- Recherche d'ADN chez les truies et les verrats de race Large White, de même que chez les verrats de race Meishan : 1 tube EDTA de 10 ml par truie et 3 tubes EDTA de 10 ml par verrat
- Détermination du groupe sanguin des truies, des verrats et des porcelets de race Large White : 1 tube sec de 10 ml par animal
- Détermination du caryotype des cochettes et verrassons de race Meishan : 1 tube héparine de 10 ml par animal

Pour l'intégralité du projet, sur une durée de 5 ans, il est prévu de collecter du sang sur :

- Les animaux reproducteurs Large White = 250 animaux maximum sur 5 ans (1 animal = 1 détermination du groupe sanguin + 1 détermination d'ADN)
- Les animaux reproducteurs Meishan = 250 animaux maximum sur 5 ans (1 animal = 1 détermination du caryotype + 1 détermination d'ADN)
- Les porcelets expérimentaux = 2500 animaux maximum sur 5 ans (1 animal = 1 détermination du groupe sanguin)

Ce projet utilisera donc au maximum 3000 animaux, et plus précisément 2500 porcelets et 500 adultes.

Règle des trois R :

- Remplacer : Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle ; il s'agit spécifiquement de sélectionner des porcelets pour des expérimentations.
- Réduire : Ces analyses permettront de réduire les animaux utilisés par la suite et surtout d'exclure des porcelets qui pourraient biaiser les résultats du fait d'anomalies.
- Raffiner : Tous les animaux proviennent de notre élevage. Ils sont manipulés dans le calme de façon à limiter au maximum le stress et chaque animal est remis dans sa loge, avec ses congénères après la prise de sang. Le seul dommage induit est une douleur liée à une prise de sang. En cas d'un saignement trop important, un point de compression est appliqué sur l'animal. En cas de malaise, l'animal est isolé et des soins sont réalisés.

**8516** Il a récemment été montré que l'ocytocine avait un impact bénéfique sur le comportement social des mammifères. L'ocytocine est une hormone naturellement produite dans le cerveau par l'hypothalamus. Elle est connue depuis longtemps pour son rôle lors de l'accouchement et de la lactation. Cependant, l'ocytocine agit également en tant que neuromodulateur dans le cerveau, jouant alors un rôle important dans la régulation du comportement social chez l'homme et l'animal. De précédentes recherches ont également montré que l'apparition de l'autisme pouvait être favorisée par un déficit d'ocytocine au moment de la naissance. A l'inverse, l'administration d'ocytocine à l'aide d'un spray intra-nasal améliore les aptitudes sociales en augmentant les capacités de mémorisation des visages, de reconnaissance des émotions, de la confiance envers autrui représentant une nouvelle stratégie à très fort potentiel thérapeutique.

Même si la recherche dans ce domaine est en forte progression, des questions fondamentales quant à l'identification des bases neurales de l'action de l'ocytocine restent à éclaircir. Ainsi, le principal objectif de ce projet est de caractériser de façon détaillée d'un point de vue anatomique et fonctionnel le système ocytocinergique dans le cerveau de souris adulte. Ces analyses seront réalisées grâce à l'injection dans l'hypothalamus de vecteurs viraux qui permettront de marquer les projections de ce réseau dans le cerveau de différentes souches de souris connues pour manifester des comportements plus moins sociaux. Ainsi cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de l'ocytocine endogène dans la communication.

Ce projet d'une durée de 3 ans a été élaboré pour répondre à des questions fondamentales sur la compréhension du système ocytocinergique, tout en adoptant une approche expérimentale respectueuse de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), préconisée pour une recherche sur l'animal à des fins scientifiques et cliniques.

1) Remplacement : Comme notre projet de recherche porte sur l'anatomie et la fonction d'une région cérébrale (l'hypothalamus), les études *in vitro* ou la modélisation ne peuvent pas constituer des modèles expérimentaux satisfaisants et le recours aux animaux est nécessaire pour cette étude.

2) Réduction : Dans un premier temps, une étude pilote limitée à 30 animaux sera réalisée pour valider l'ensemble de l'approche expérimentale. Les autres animaux seront inclus uniquement si le projet pilote donne des résultats préliminaires satisfaisants. Le nombre total d'animaux pour ce projet qui

comporte deux études a été réduit sans compromettre l'objectif du projet qui est de comparer d'un point de vue anatomique et fonctionnel le réseau des neurones ocytocinergiques chez quatre souches de souris. Un nombre maximum de 138 animaux exposés à un ensemble de procédures expérimentales (légères et modérées) permettra de généraliser statistiquement les résultats obtenus (réduction minimale pour généraliser les effets, compte tenu de la variabilité interindividuelle).

3) Raffinement : Ces travaux de recherche fondamentale nécessitent des observations sur des animaux vivant dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Les souris utilisées pour ce projet sont nées et ont été élevés dans des établissements agréés. Le bien-être des animaux est impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

Les résultats de ces travaux permettront dans un premier temps d'approfondir la connaissance du système ocytocinergique. Les données obtenues chez le rongeur ont considérablement accrue notre compréhension du système nerveux central. Ainsi ces travaux de recherche permettront également d'identifier les bases neuronales du comportement social et de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées. Les approches expérimentales étant limitées chez l'homme, le modèle rongeur en particulier reste essentiel pour le développement de nouvelles thérapies. A moyen et long-terme, ces expériences pourraient avoir des applications cliniques pour des pathologies telles que l'autisme et l'anxiété sociale.

**8517** La peau, indispensable au maintien de la survie de l'organisme, assure une fonction de barrière, de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur, de régulation de la température corporelle et participe à la défense immunitaire. Lors d'agressions du revêtement cutané comme les brûlures (d'origine thermique, chimique, électrique ou radiologique...) la perte de l'intégrité de la peau peut induire un profond déséquilibre physiologique pouvant aller jusqu'au décès, en particulier lors de septicémie. Le plasma froid est un gaz ionisé avec une température proche de la température ambiante. Son application au domaine médical est un sujet en pleine expansion depuis quelques années. En effet, les dispositifs plasmas sont sources en milieu liquide d'espèces réactives oxygénées et nitrées qui réagissent avec et agissent sur des cibles biologiques. De récentes études ont ainsi montré que les plasmas, par le biais de ces molécules, permettent de promouvoir la différenciation cellulaire et le développement tissulaire, induire l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins) et avoir des effets bactéricides. Ces plasmas peuvent être utilisés directement pour traiter une cible (traitement direct) ou bien indirectement pour traiter un liquide qui sera appliqué ultérieurement sur la cible (traitement indirect). Ces liquides sont appelés milieu activés par plasma (PAM, plasma activated media). L'incidence des brûlures dans le monde est assez importante pour que les hôpitaux et la recherche s'y intéressent de prêt. En effet, c'est un peu plus de 11 millions de personnes qui sont touchés par an dans le monde (2004). Si la mortalité diminue depuis quelques dizaines d'années, c'est grâce au progrès de la médecine et de la science. Les objectifs de notre projet sont de montrer les effets d'un traitement plasma direct sur un modèle de plaie cutanée « brûlure du troisième degré de diamètre 1 cm » et de montrer l'influence d'une molécule produite par le plasma, l'oxyde nitrique (NO), sur le processus de cicatrisation et en particulier sur la création de nouveaux vaisseaux sanguins dans la région de la plaie. En effet, la création de ces vaisseaux est importante pour la cicatrisation (apport de nutriments et de cellules permettant de combattre les infections) et l'oxyde nitrique joue un rôle essentiel dans ce procédé. Cette étude permettra donc d'étudier l'influence d'un traitement de type plasma froid sur la cicatrisation d'une brûlure mais aussi de mieux comprendre la contribution du NO. Pour étudier son effet, positif ou négatif sur la cicatrisation et l'angiogenèse, nous utiliserons soit une molécule libérant le NO dans la plaie ou une molécule qui empêche la sécrétion de NO par les cellules de la souris. Un deuxième essai sera réalisé pour étudier l'effet du plasma sur l'angiogenèse mais sans induire une blessure chez l'animal. Notre expérience consistera à injecter du collagène (présent naturellement dans la peau des souris) contenant des facteurs de croissance pour les vaisseaux sanguins et de voir si le plasma stimule la croissance de ces vaisseaux sanguins dans le collagène injecté. Des expériences *in vitro* et *ex vivo*, réalisées précédemment sur des cellules de la peau et des cellules de vaisseaux sanguins ont donné des résultats positifs : le plasma stimule la prolifération et la migration des cellules *in vitro* mais aussi

la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de prélèvements de cellules de vaisseaux sanguins chez la souris. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum lors de cette étude. De même, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques seront administrés pour diminuer la douleur et apaiser les animaux. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant le sacrifice anticipé de l'animal si nécessaire, c'est-à-dire si la souffrance de l'animale est jugée trop importante. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir pour l'étude sur la brûlure 6 animaux par condition, à raison de 6 conditions pour chaque condition expérimentale pour l'étude sur la brûlure étudié, analysés à 3 temps distincts (pic inflammatoire, prolifération et maturation de la plaie) (soit 108 animaux). Dans le cas de l'étude sur l'angiogenèse, 5 animaux suffiront pour conclure de manière statistique et nous utiliserons 2 conditions soit 10 animaux utilisés. Une utilisation de 118 souris est donc prévue sur cette période de 1 an. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation de ces souris. En effet, le plasma, en distribuant des espèces actives, agit non seulement sur les cellules cibles mais aussi sur l'équilibre moléculaire *in vivo* à la fois localement mais aussi de manière plus diffuse autour de la zone traitée. Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, la précision et la reproductibilité de la technique ont été validés précédemment sur des cellules cutanées isolées *in vitro*. De plus le protocole de brûlure a elle aussi été mis en place, optimisé et validé *in vivo*. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de coton et de boîte à œufs dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

**8518** L'os est le tissu le plus greffé chez l'homme avec 1 million d'interventions pratiquées par an en Europe. Outre la greffe d'os autologue ou allogénique, une alternative qui s'impose progressivement est l'ingénierie tissulaire. Elle consiste à isoler des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à partir d'un prélèvement de moelle osseuse autologue et à l'associer à un biomatériau de type biocéramique phosphocalcique. La greffe de CSM allogéniques serait une avancée majeure en simplifiant les étapes de culture, de logistique et de contrôle qualité des lots cliniques. Ce projet vise à étudier l'impact de l'inflammation et de l'immunité sur la formation osseuse après transplantation de cellules souches mésenchymateuses d'origine syngénique ou allogénique chez le rat. Pour cela, des CSM de rats seront associés à des BCP (particules de phosphate de calcium biphasé) et implantées en site sous-cutané ectopique soit à des rats consanguins (modèle syngénique), soit à des rats d'une autre lignée (modèle allogénique). L'impact de l'inflammation / immunité sur la formation osseuse, les différentes cellules (macrophages, neutrophiles, lymphocytes T et B etc) seront analysées par immunohistochimie, cytométrie et microscanner. Cette expérimentation respecte le principe des 3R : il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour étudier la formation osseuse, étape pré-clinique indispensable avant des essais chez l'homme ; la réduction du nombre d'animaux est fixé par une analyse de puissance statistique indiquant n=6/groupe et 2 implants sous cutanés dorsaux par rat donnant un nombre total de 192 rats pour les 2 souches et 4 délais d'implantation ; Le raffinement est assuré par la gestion de la douleur postopératoire, la définition de points limites et l'enrichissement du milieu.

**8519** Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 10 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer. Il existe différents types de tumeur maligne de la vessie. Le carcinome transitionnel est la forme la plus fréquente (90 % des cancers de la vessie) suivi par le carcinome épidermoïde (7 %) et l'adénocarcinome (1 %). Les lésions non carcinomateuses correspondent aux lymphomes, sarcomes et tumeurs neuro-endocrines de la vessie dont le traitement diffère des carcinomes.

La paroi interne de la vessie est tapissée de cellules transitionnelles qui sont à l'origine de la plupart des cancers de la vessie. L'évolution et la prise en charge dépendent beaucoup du caractère invasif

de la tumeur. On distingue le cancer superficiel de la vessie du cancer invasif, lequel, plus agressif, nécessite des traitements plus lourds. Le traitement des tumeurs de la vessie dépend de leur nature et de leur caractère infiltrant ou non et métastatique ou non. Les moyens thérapeutiques sont la chirurgie, la radiothérapie externe, la chimiothérapie et l'immunothérapie avec traitement endo-vésical ou systémique.

Si le cancer superficiel reste de bon pronostic, le risque de rechute suite à l'ablation des tumeurs par les voies naturelles reste élevé, ceci étant dû, en partie, aux tumeurs résiduelles non détectables par endoscopie conventionnelle. C'est pourquoi, une nouvelle technique consiste à procéder à une ablation chirurgicale guidée par la fluorescence de molécules photoactivables (appelées photosensibilisateurs) localisées préférentiellement dans les lésions tumorales. La molécule ayant reçu l'AMM en 2005 pour ce type de procédure est l'Hexvix® (h-ALA), une pro-drogue à base d'acide 5-aminolévulinique qui est métabolisée en un produit fluorescent (protoporphyrin IX) au niveau des tumeurs. Cependant, malgré le taux de tumeurs résiduelles significativement inférieur obtenu par cette méthode, le nombre de faux positifs est plus élevé que lors d'une ablation chirurgicale classique. Ceci peut être imputé à l'imparfaite sélectivité tumorale du photosensibilisateur. D'autres inconvénients comme la fluorescence restreinte aux couches superficielles des tissus et la photodégradation rapide de la molécule incitent à rechercher des molécules plus performantes. Ces photosensibilisateurs peuvent également être utilisés pour détruire les tumeurs vésicales en utilisant une méthode de traitement appelée thérapie photodynamique ou PDT.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de 2 nouveaux photosensibilisateurs, ALA-Y et ALA-Z, qui ont été sélectionnés par rapport à leur sélectivité du tissu tumoral précédemment évaluée, et de l'Hexvix® comme traitement de référence, sur le traitement de tumeurs vésicales par PDT chez le rat, ce qui ne peut être réalisé sur des modèles *in vitro* ou *in silico* (remplacement). 208 rats femelles Fischer 344 seront utilisés pour ce projet, répartis en groupes de 4 à 8 animaux. Les animaux seront placés à 2 par cage, sans enrichissement du milieu pour comparer les résultats avec les précédentes études effectuées dans les mêmes conditions. L'Hexvix® sera administré par instillation vésicale (par les voies naturelles) à 2 concentrations différentes et les 2 composés ALA-Y et ALA-Z à 2 concentrations différentes également, sur des tumeurs orthotopiques de vessie induites chez les animaux 5 jours auparavant. Ces composés ne sont pas génotoxiques pour les cellules, pas toxiques pour les animaux aux doses testées, et ils n'induisent pas d'allergie.

L'induction de tumeurs de vessie est effectuée sous anesthésie par abrasion de la surface de la vessie sur une zone limitée dans l'axe de la vessie à l'aide d'un abraseur introduit par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans les voies naturelles (urètre), suivie de l'instillation vésicale de cellules tumorales de vessie d'origine murine. Cinq jours après induction des tumeurs vésicales, les animaux sont à nouveau anesthésiés et chaque composé à tester est administré dans la vessie (instillation) par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans l'urètre et laissé au contact de la vessie pendant 1 heure avant réalisation du traitement par PDT avec irradiation en lumière rouge pour l'Hexvix® et les 2 composés ALA-Y et ALA-Z. Les animaux sont mis à mort à différents temps après le traitement par PDT par injection d'une surdose d'anesthésique. La vessie est alors prélevée, fixée ou congelée dans de l'azote liquide pour effectuer les analyses en histologie classique et en microscopie de fluorescence après réalisation de coupes à froid (cryostat). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les groupes de traitement seront constitués de 8 rats et les groupes d'animaux témoins de 4 rats. Les analyses seront effectuées à un stade de développement des tumeurs non invasif, y compris un mois après traitement, ce qui limite l'impact de la maladie sur l'animal (raffinement). Pour supprimer la douleur induite éventuellement par l'induction des tumeurs vésicales et par le traitement par PDT, les animaux recevront deux injections sous-cutanées de Buprénorphine pour l'induction tumorale (1 heure avant et 24 heures après celle-ci), et également deux injections sous-cutanées pour le traitement par PDT (1 heure avant et 24 heures après celui-ci). Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, tremblements...) et leurs consommations alimentaire et hydrique. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'anesthésique).

**8520** Notre société est une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. Dans le cadre de ces projets, la société peut être amenée à évaluer des principes actifs fournis et créés par nos clients qui ont pour but de réduire la perte osseuse qui a lieu dans des cas d'ostéoporose consécutive à un traitement de longue durée aux glucocorticoïdes. Ces principes actifs doivent sensiblement réduire la perte osseuse et induire moins d'effets secondaires que les composés existant sur le marché. Le but de cette saisine est de mettre au point un modèle qui mime la pathologie humaine d'ostéoporose induite par glucocorticoïdes, puis d'évaluer l'efficacité de différents principes actifs administrés par voies parentérales ou orale. La perte osseuse sera induite par des Glucocorticoïdes chez la souris.

Ce projet est divisé en deux étapes :

Procédure expérimentale n°1 : Dans un premier temps 30 souris femelles seront utilisées pour la mise au point du modèle. Pour induire une perte osseuse, une capsule contenant des Glucocorticoïdes sera implantée en sous-cutanée. Elle permet le relargage quotidien de glucocorticoïde à une dose définie. Trois groupes seront constitués de 10 animaux âgés de 4 mois. Le premier sera constitué de 10 souris implantées avec une capsule contenant un placebo, le deuxième de 10 souris implantées avec une capsule contenant une dose de Glucocorticoïde qui sera délivrée à hauteur de 2,1mg/kg/jour et le troisième de 10 souris implantées avec une capsule contenant une dose de Glucocorticoïde qui sera délivrée à hauteur de 5mg/kg/jour. Les Glucocorticoïdes seront relargués pendant 28 jours. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang. Afin d'évaluer la vitesse de formation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de fluorochromes par voie sous-cutanée avant leur sacrifice. La durée de la procédure est de 28 jours. Cette étude permettra de définir la dose quotidienne à administrer et également d'affiner les points limites qui seront déterminés selon les données de la littérature pour cette première étude.

Procédure expérimentale n°2 : Une fois, le modèle validé, différents principes actifs en comparaison à un produit de référence seront étudiés et appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. 10 animaux par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe implanté avec une capsule contenant un placebo sans traitement, un groupe implanté avec des Glucocorticoïdes sans traitement et un groupe implanté avec des Glucocorticoïdes avec un traitement de référence, seront ajoutés aux protocoles. Il y aura au maximum 1500 souris dans cette seconde procédure. Par étude, une moyenne de 100 animaux sera étudiée et ceux-ci seront répartis dans 10 groupes de traitement (2 groupes témoins, 1 groupe traité avec le produit de référence et 7 groupes traités avec les principes actifs). Nous estimons que ce type d'étude sera réalisé 3 fois par an. Donc sur 5 ans, 1500 animaux seront nécessaires. Les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les traitements ainsi que le produit de référence sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. Selon le protocole le plus adapté aux composés à tester, des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux, du métabolisme phosphocalcique dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse. Afin d'évaluer la vitesse de formation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de fluorochromes par voie sous-cutanée avant leur sacrifice. La durée de la procédure dépendra du schéma thérapeutique appliqué qui est dépendant des principes actifs étudiés. A chaque sacrifice et/ou à l'issue du protocole animal, une analyse macroscopique du site d'implantation sera réalisée. En parallèle, les analyses suivantes pourront être réalisées : une analyse microscanner des os longs qui permettra d'évaluer les modifications de l'architecture osseuse, des tests mécaniques qui permettront d'évaluer la résistance de l'os et des analyses histologiques qui permettront d'analyser les modifications tissulaires du tissu osseux. Les implantations et les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'implantation entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période peropératoire et postopératoire (une injection 30



minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort. Ces procédures seront menées dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont en général testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum avec un total de 1530 animaux pour les deux procédures afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis sur la base de la littérature et seront affinés/adaptés en fonction des observations faites lors de la première procédure. Ces points-limites sont déterminés afin d'éviter toute souffrance inutile. Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement).

**8521** La sclérodémie systémique (ScS), une maladie auto-immune rare (9/100000 habitants) et au pronostic vital sombre dans les formes sévères. Elle associe une vasculopathie (atteinte des cellules endothéliales des petits vaisseaux), des anomalies immunologiques (présence d'auto-anticorps et de cellules immunes auto-réactives) et une fibrose touchant la peau et les organes internes. A ce jour, il n'existe aucune stratégie thérapeutique efficace, notamment contre la fibrose qui est responsable d'une altération profonde de la qualité de vie des patients et qui grève leur espérance de vie. Ainsi il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette maladie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient améliorer le devenir des patients atteints de ScS.

Des études récentes suggèrent un rôle néfaste, dans la pathogenèse de la ScS, des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), qui sont une population de cellules immunitaires spécialisées dans la production de médiateurs inflammatoires en réponse aux infections virales. De plus, un lien génétique fort a été établi entre une enzyme nommée Dnase1L3 et la ScS, notamment chez les patients ayant un taux élevé d'auto-anticorps. Nous avons décrit précédemment que la fonction principale de cette enzyme est de dégrader l'ADN libéré par les cellules mourantes sous forme de microparticules. Alors que des résultats récents montrent l'importance des microparticules pour l'induction de la ScS, le rôle des pDCs et de la Dnase1L3 dans la pathologie *in vivo* et dans quelle mesure la Dnase1L3 contribue à modifier les capacités immunogéniques et pro-fibrotiques des microparticules restent à démontrer.

Pour répondre à ces questions nous proposons d'utiliser des modèles animaux de la ScS. Malgré des approches *ex vivo* et *in vitro* qui seront utilisées pour répondre à certaines questions spécifiques relatives à ce projet, il n'y a pas d'alternative aux modèles murins et aux études dans un organisme *in vivo* récapitulant la complexité des interactions existant entre les différents acteurs cellulaires et tissulaires en cause dans la ScS. De plus, les modèles murins de ScS seront établis dans les souris génétiquement modifiées à la fois déficientes pour notre enzyme d'intérêt et pour les pDCs, permettant ainsi d'établir des liens causatifs entre la pathogenèse de la ScS et ces acteurs moléculaires et cellulaires, respectivement. De plus les modèles murins de la ScS ont de nombreuses caractéristiques comparables à la pathologie humaine, comme la fibrose cutanée, et permettront ainsi un transfert plus efficace de nos résultats aux patients. En plus de caractériser les mécanismes de la ScS, nous analyserons le potentiel thérapeutique de leur ciblage dans la protection contre le développement de la ScS.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 2220 souris sont demandées sur une période de 3 ans. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire et optimiser leur nombre. Des méthodologies de culture cellulaire et de modélisation *in vitro* ont été également implémentées afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux. Finalement, afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux.

**8522** L'agent pathogène du paludisme, Plasmodium, est un parasite du phylum Apicomplexa. Le paludisme est une maladie parasitaire dévastatrice et potentiellement mortelle, causant un demi million de décès par an, principalement des nourrissons en Afrique subsaharienne (WHO, 2015). L'équipe s'intéresse aux mécanismes de traduction chez le parasite et l'hôte vertébré.

L'objectif du projet proposé est de comprendre le rôle que jouent les ARNt hôtes dans le processus infectieux du parasite. Il s'agit d'approfondir notre connaissance de la fonction et de la structure de la machinerie d'import des ARNt et comprendre comment les ARNt de l'hôte sont sélectionnés, transportés, et affectent l'expression des gènes du parasite et donc son développement. Ce projet traite d'une question clé sur les interactions hôte-pathogène dans le paludisme et met l'accent sur le rôle des ARNt hôtes sur le cycle de vie de Plasmodium. Son aspect fondamental devrait mettre en évidence de nouveaux mécanismes de régulation de l'expression des gènes dans le parasite. En outre, ce travail peut conduire à une étude plus appliquée pour concevoir de nouvelles molécules antipaludiques.

Pour développer ce projet, il est nécessaire de produire des parasites de Plasmodium berghei, le parasite murin. Le cycle de développement de Plasmodium est particulièrement complexe. Lors de la piqûre, le moustique femelle prélève du sang contenant les nutriments nécessaires à la maturation de ses œufs. De manière concomitante, le moustique infecté injecte de la salive et les sporozoïtes qu'elle contient. Les sporozoïtes migrent rapidement vers le foie, infectent les hépatocytes, s'y multiplient intensément (stade hépatique). Les parasites produits sont libérés dans le flux sanguin. Ils envahissent les globules rouges de l'hôte et s'y multiplient (stade sanguin). Le globule rouge infecté éclate et libère les nouveaux parasites, prêts à entamer un nouveau cycle sanguin. Les symptômes du paludisme sont causés essentiellement par le stade sanguin du parasite, le stade hépatique étant asymptomatique. Le parasite se propage car un moustique femelle va ingérer Plasmodium lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Le parasite va se développer jusqu'à produire des sporozoïtes qui s'accumuleront dans les glandes salivaires du moustique, et ainsi de suite.

L'ensemble de ces expériences seront faites en suivant scrupuleusement la règle des 3 R :

**REMPLETER** : P. berghei ne peut pas compléter son cycle *in vitro* et ne peut donc pas être produit sans utiliser d'animaux (moustiques et souris). En effet, on peut reconstituer ce cycle d'infection dans le laboratoire uniquement en utilisant des souris (i) comme donneurs de sang pour permettre la ponte des femelles anophèles (qui ne peuvent pas être nourries artificiellement sur membrane, car il est nécessaire de conserver le même régime alimentaire pour tous les moustiques) (ii) dans le processus d'infection des anophèles par Plasmodium berghei, (iii) dans la propagation du stade sanguin du parasite et (iv) pour la production d'anticorps.

**REDUIRE** : Au cours des 5 prochaines années, nous avons prévu d'utiliser un total de 514 souris pour faire l'ensemble des expériences *in vivo*. Ce projet se limite aux expériences considérées comme absolument indispensables et prévoit l'exploitation maximale des données obtenues. Lorsque ce sera possible nous utiliserons une même souris pour deux expériences différentes.

**RAFFINER** : Ce souci de raffinement est une préoccupation permanente tout au long de la vie des animaux et pendant les différentes étapes des protocoles expérimentaux. Ainsi, les souris sont anesthésiées lorsque les procédures expérimentales sont jugées potentiellement douloureuses (les repas non infectieux et infectieux des moustiques par exemple). Les animaux sont élevés dans un environnement enrichi, ils sont observés quotidiennement. Nous appliquons les points limites établis préalablement et utilisons les procédures de sacrifice appropriées. L'état de santé des souris infectées est strictement contrôlé quotidiennement avec analyse de la parasitémie sanguine et observation du comportement des animaux. Tout animal montrant les premiers signes physiques du paludisme sévère (fort ralentissement moteur ou prostration) est automatiquement mis à mort quel que soit le moment de l'expérience. Le personnel de l'animalerie est extrêmement compétent et nous rapporte minutieusement les moindres signes de souffrance dès leur apparition.

\* Les ARNt sont des ARN non codants utilisés comme adaptateurs dans la synthèse des protéines. Cependant, des études récentes montrent que les ARNt pourraient avoir des propriétés régulatrices.

**8523** La fibrose cardiaque marque l'évolution vers l'insuffisance cardiaque quelque soit la nature de la cardiopathie. La fibrose a des conséquences irréversibles sur la rigidité (ou élasticité) du ventricule gauche, qui peut se traduire par l'apparition d'une insuffisance cardiaque alors même que la

contractilité du myocarde n'est pas encore atteinte. En particulier, avec le vieillissement de la population, l'augmentation croissante de l'insuffisance cardiaque à fonction contractile conservée comme du rétrécissement de la valve aortique témoigne de l'incidence des anomalies de compliance et de relaxation cardiaque.

Le but de ce projet est d'évaluer un nouvel outil diagnostique appelé « élastographie » permettant d'envisager un dépistage de masse des anomalies de la rigidité (ou élasticité) du myocarde, premier pas vers une prise en charge optimisée des patients.

Nous utiliserons un lot de brebis de 40 à 50 kg chez lesquelles nous évaluerons l'impact des conditions physiologiques (fréquence cardiaque, augmentation ou diminution des conditions de charge pesant sur le fonctionnement du cœur, augmentation ou diminution de la contractilité, ...) sur la mesure de l'élasticité cardiaque en élastographie. Les mesures seront comparées à des mesures invasives effectuées à l'aide d'un capteur de pression et de volume placé dans le ventricule gauche des animaux. Toute l'expérimentation sera réalisée sous une anesthésie et une analgésie profondes pour prévenir la douleur chez l'animal. A l'issue de la procédure, le cœur sera utilisé pour analyser son architecture en Imagerie par Résonance Magnétique.

Selon la littérature, le nombre d'animaux nécessaire est de 12. Récemment, 10 animaux ont été suffisants pour montrer une différence entre infarctus et sidération myocardique. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, une analyse intermédiaire sera réalisée après l'exploration des 8 premiers, et l'étude sera arrêtée en cas de résultats significatifs.

Afin de respecter la règle des trois R, les procédures expérimentales prévues dans le cadre de cette recherche ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum, selon les calculs d'effectifs effectués en s'appuyant sur des études précédentes, et des tests statistiques appropriés seront utilisés afin de mettre en évidence les résultats attendus.

Dans un souci de raffinement, le long de l'expérience, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Mots clefs : insuffisance cardiaque, fibrose, élastométrie, module de Young, hémodynamique.

**8524** Les formulations à libération prolongée de certaines molécules sont prescrites aux patients afin de limiter le nombre d'injections à réaliser. Il est primordial de vérifier la conformité de chaque lot de ces formulations en termes de cinétique et taux de diffusion avant l'administration aux patients. Cette vérification, demandée par les autorités réglementaires, est majoritairement réalisée par des tests *in vitro*. Cependant, les autorités de certains pays n'ont pas encore approuvé cette méthode de substitution et exigent donc encore la validation des lots par la méthode *in vivo* historiquement approuvée. Des discussions sont en cours auprès de ces autorités pour faire approuver au plus vite cette méthode de remplacement et ainsi éviter le recours aux animaux : 4 pays concernés UE et hors UE.

Ce projet a pour objectif d'évaluer d'un point de vue pharmacodynamique différents lots de formulation prolongée de molécules approuvées chez l'homme. Pour ce faire, les différents lots sont injectés à des rats adultes anesthésiés dans un muscle de la cuisse dans un petit volume (50µL) afin de limiter la douleur liée à l'injection. Le sang des animaux est ensuite prélevé plusieurs fois de manière à mesurer d'une part les concentrations de produit dans le sang (pharmacocinétique) et d'autre part certains biomarqueurs d'efficacité (les mêmes que ceux utilisés chez les patients). Tous les prélèvements sont réalisés sous anesthésie générale et les volumes et fréquence de prélèvement sont planifiés de manière à ne pas affecter l'état général des animaux ni induire de stress inutile, selon les recommandations spécifiques existantes.

L'anesthésie utilisée est une anesthésie gazeuse par inhalation qui permet un réveil rapide lorsqu'elle est arrêtée. Les animaux ne sont jamais hébergés seuls et disposent d'un enrichissement. Une visite sanitaire quotidienne afin de s'assurer du bon état général des animaux.

Des groupes de 6 animaux par lot et par mois de traitement sont nécessaires. Le nombre de lots à tester sur la durée totale du projet (1 an) est estimé à 40. Le nombre total d'animaux utilisés sur la durée totale du projet est estimé à 450.

**8525** Notre équipe s'intéresse aux microcircuits neuronaux et à la plasticité synaptique impliqués dans la formation de mémoires. L'hippocampe est une structure cérébrale clé pour la formation de nouvelles mémoires. Notre recherche est focalisée sur la région CA2, une région qui est impliquée dans la formation de la mémoire sociale (c'est-à-dire la capacité de reconnaître un congénère), et le codage de l'espace pendant l'immobilité et qui reçoit des afférences directes de plusieurs structures cérébrales. Longtemps ignorée, cette petite région de l'hippocampe est en train d'émerger comme une région distincte de l'hippocampe avec des propriétés et une composition cellulaire unique. De plus, les neurones de la région CA2 sont particulièrement vulnérables lors de l'apparition de maladies psychiatriques comme la schizophrénie et la démence et ceci a été reproduit dans des modèles murins de la pathologie.

Ce projet vise à déterminer les conditions qui activent la région CA2, quelles en sont les conséquences comportementales et quels mécanismes conduisent aux déficits observés dans la pathologie psychiatrique. Seule l'utilisation de modèles murins permet de mimer la physiologie et la pathologie humaine et d'étudier des modifications de marqueurs physiologiques ou des déficits comportementaux (sociaux, cognitifs ou sensoriels). Nous utiliserons 2600 souris pour une durée de cinq ans. Différentes lignées de souris, transgéniques ou non transgéniques seront utilisées dans une combinaison de techniques utilisant la souris *ex vivo* et *in vivo* (électrophysiologie, optogénétique, histologie et étude du comportement) qui ne peuvent être remplacées par des méthodes substitutives. Notre projet met en jeu des procédures chirurgicales, d'administration de substances pharmacologiques et virales avant étude physiologique ou anatomique et une évaluation des fonctions cognitives, émotionnelles et sociales des souris à l'aide de différents tests comportementaux. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie et de prélèvement se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis. Ce projet apportera des données importantes sur le fonctionnement de l'hippocampe et son implication dans les réponses cognitives, émotionnelles et sociales qui sont touchées dans les pathologies psychiatriques.

**8526** Le principal objectif de ce projet est de proposer à la communauté scientifique des protocoles d'anesthésie et d'analgésie qui soient validés et standardisés chez la plupart des modèles animaux (Souris, Rats, rats *Arvicanthis*, poissons-zèbres et xénopes). Dans le projet présenté ici, seuls les tests sur souris sont réalisés au sein de notre institut. Les tests sur autres espèces sont réalisés dans d'autres centres de notre réseau de travail et font donc l'objet de demandes d'autorisation de projet distinctes.

Nous souhaitons standardiser les protocoles anesthésiques chez la souris afin de travailler dans un meilleur respect du bien-être animal mais également pour contrôler les interactions expérimentales entre les produits utilisés pour l'anesthésie et les résultats expérimentaux (reproductibilité des données).

De plus, nous souhaitons introduire des protocoles assez inusités afin de proposer des alternatives à l'utilisation de certaines drogues qui sont soit difficiles à se procurer soit qui ont un effet sur certaines thématiques de recherche.

- Remplacement : La recherche scientifique a encore besoin d'animaux. Notre projet doit permettre de mieux connaître les protocoles anesthésiques utilisés et donc mieux choisir les protocoles utilisés pour anesthésier des animaux dans d'autres projets. Il semble donc difficile de tester ces protocoles sans utiliser d'animaux.

- réduction : L'expérience de notre institut quant au suivi de paramètres cardiovasculaires a montré que des groupes d'animaux de 9 sont nécessaires pour la mise en évidence de différences significatives entre 2 groupes. Nous nous baserons sur ces effectifs pour cette étude ce qui mène l'effectif total à un maximum de 180 souris.

- raffinement : Aucun dommage ni aucune douleur ne sont attendus, le but du projet étant justement de proposer des procédures d'anesthésie raffinées pouvant être appliquées à d'autres projets. Les animaux feront ainsi l'objet d'un suivi vétérinaire permettant de s'assurer de leur bien-être.

**8527** Certaines pathologies sont liées à un mauvais fonctionnement ou une absence de reconnaissance du système immunitaire (déficit immunitaire, maladies auto-immunes, maladies cancéreuses). Des traitements par des anticorps mono- ou polyclonaux (protéines humaines ou animales, plasmatisques ou recombinantes) participent à la prise en charge de ces maladies graves. Ces derniers permettent de stimuler ou de réguler le système immunitaire.

Dans le cadre du développement de ces nouveaux médicaments, la caractérisation de leur devenir dans l'organisme (pharmacocinétique, PK) est indispensable aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. Les études PK permettent :

- la sélection entre différents médicaments candidats sur la base de ses propriétés (concentrations circulantes, exposition, durée de présence dans l'organisme),
- la sélection des posologies aussi bien dans les modèles animaux d'efficacité et de toxicité que dans les essais cliniques chez l'Homme,
- la sélection de la voie d'administration,
- la corrélation entre l'activité pharmacologique (PD) et les paramètres PK,

Ces études PK chez l'animal sont donc réglementairement requises et ne peuvent pas être remplacées par des études *in vitro*, qui ne permettent pas d'étudier un phénomène à l'échelle de l'organisme entier.

L'efficacité du traitement par les anticorps mono- ou polyclonaux est en partie due à leur persistance prolongée dans l'organisme, gouvernée par un récepteur appelé FcRn. Une différence importante au niveau de ce récepteur existe entre les rongeurs et l'Homme. Aussi, des modèles murins exprimant uniquement le FcRn humain seront utilisés dans cette étude.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'évolution au cours du temps de la concentration des anticorps mono- ou polyclonaux après administration unique ou répétée chez le rongeur. Les produits testés sont administrés par voies intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire. Des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps afin de déterminer si le produit persiste plus ou moins longtemps dans la circulation, quelle est sa concentration maximale, quelle est l'exposition totale du modèle animal à ce produit. Plusieurs prélèvements sanguins sont nécessaires (maximum 10) pour suivre au mieux l'évolution de la concentration en fonction du temps. Les animaux sont sacrifiés après le dernier prélèvement.

Les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Dans le cadre de ce projet prévu sur 5 ans, le nombre maximal d'animaux nécessaire est de 2000. Ce nombre a été déterminé grâce aux données de la littérature et de données internes. Il a été réduit au minimum nécessaire afin de garantir la validité des résultats. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection afin de réduire la souffrance des animaux. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe associé à des éléments d'enrichissements permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général, mobilité et poids) tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**8528** Les traumatismes sévères ou les résections de tumeurs osseuses nécessitent des reconstructions du squelette. L'os est le tissu le plus transplanté chez l'homme avec 1 million de transplantation chaque année en Europe. Cependant, la transplantation d'une greffe osseuse nécessite un second site chirurgical et le stock osseux du patient est limité.

Les biomatériaux à base d'os bovin sont largement utilisés pour le comblement de pertes osseuses, notamment en chirurgie maxillofaciale. Les membranes de régénération osseuse guidée à base de collagène porcine sont également utilisées pour isoler les tissus mous de la cavité osseuse. Cependant, ces matériaux d'origine animale présentent un risque de transmission d'agents pathogènes ou de rejet immunologique. Des études ont montrées que les substituts osseux synthétiques à base de phosphate de calcium ont des propriétés d'ostéoinduction mais la régénération de défauts osseux de taille critique n'a pas été démontrée.

L'objectif de ce projet est de vérifier l'efficacité d'un nouveau biomatériau de substitution osseuse synthétique associé à une nouvelle membrane synthétique dans un modèle de défaut mandibulaire chez le rat. Les résultats seront comparés à des biomatériaux de référence et à un défaut laissé vide (contrôle négatif). Sous anesthésie générale, un défaut osseux de taille critique (4,5 mm de diamètre)

sera réalisé au niveau de la mandibule de rats. Les défauts seront comblés avec des granules d'os bovin ou de substitut osseux synthétique et recouverts d'une membrane de régénération osseuse guidée de collagène porcin ou synthétique. Deux autres groupes sans substituts osseux mais recouverts de membrane seront réalisés. Au total 5 groupes d'animaux seront considérés. Après la chirurgie, les animaux recevront des injections d'analgésique pendant 3 jours et seront surveillés. Après 2 et 8 semaines, les animaux seront sacrifiés sous anesthésie générale par inhalation prolongée de dioxyde de carbone. L'inflammation sera évaluée par l'étude de l'expression des gènes à 2 semaines.

Il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer la régénération osseuse de défauts critiques. Cependant, pour le bien-être des animaux, la procédure s'accompagne d'un enrichissement de confort et de stimulation (armoire ventilée, par groupes de 3 sur copeaux). Les animaux sont surveillés pour les signes de douleurs (alimentation, comportement) et de cicatrisation. En cas d'atteinte de point limite, l'animal est sacrifié.

Le minimum d'animaux par groupe est utilisé (n=6) permettant de procéder à des tests statistiques robustes à l'issue de l'expérimentation.

Pour démontrer la repousse osseuse dans les défauts sera mesurée par radiographie et histologie à 8 semaines. 5 groupes et 2 délais d'implantation.

Un nombre d'animaux de n=6 par groupe sera considéré, soit un total de 30 animaux (5 groupes). Un test de Kruskal-Wallis sera effectué afin de mettre en évidence des différences significatives sur les résultats obtenus.

L'expérimentation pourra être réalisée 2 fois pour des raisons de reproductibilité, soit 60 animaux. Les 10 animaux supplémentaires ne seront pas utilisés si un nombre suffisant de 6 animaux par groupe est obtenu à la fin de l'étude et permet de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes.

**8529** La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, résulte en une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de cette pathologie. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAV), d'un gène thérapeutique qui est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » fonctionnelle.

Une étude pilote récente chez le rat DMD a permis d'évaluer la tolérance immunitaire et la fonctionnalité d'un tel vecteur thérapeutique (appelé ici rAAV- $\mu$ dystrophine) après une injection IV à  $1E14$  vg (vecteurs génomes)/kg.

Une étude de recherche de dose a été récemment initiée chez le rat DMD après administration de doses croissantes (de  $1E13$  vg/kg à  $3E14$  vg/kg) avec un suivi de 3 et 6 mois post injection.

L'objectif de cette nouvelle étude est d'évaluer l'efficacité du même vecteur thérapeutique à une dose de  $1E14$  vg/kg dans le modèle chien GRMD, qui a un poids approximativement 20 fois supérieur, à l'âge d'injection (2 mois), à celui du rat DMD.

Les résultats attendus sont les suivants :

- Une expression de la protéine  $\mu$ dystrophine largement distribuée dans les muscles, cœur et le diaphragme, tissus cibles de la thérapie,
- Une correction/amélioration clinique des animaux.

Cette étude permettra également de documenter :

- La biodistribution et la dissémination du vecteur AAV dans les fluides biologiques des animaux injectés,
- La réponse immunitaire (humorale et cellulaire) contre la capsid de l'AAV et la protéine  $\mu$ dystrophine nouvellement synthétisée.

Une cohorte de 5 chiens GRMD (groupe 1), AAV séronégatifs, sera incluse dans l'étude : 3 chiens seront injectés par voie intra veineuse avec le vecteur rAAV- $\mu$ dystrophine à une dose de 1E14 vg/kg, et 2 chiens seront injectés en tant que témoins avec le tampon de formulation (véhicule).

L'amendement au projet initial consiste en l'ajout d'animaux qui seront répartis comme suit :

- groupe 2 : 2 chiens GRMD injectés avec du vecteur

- groupe 3 : 2 chiens GRMD injectés avec du vecteur et 3 chiens injectés en tant que témoins avec le véhicule.

La constitution des groupes est basée sur notre expérience précédente, lors de laquelle nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. L'ajout de chiens par rapport au projet initial (groupe 1), va permettre d'obtenir des résultats plus robustes pour les groupes 1 et 3 et exploiter les données à l'aide de tests statistiques concernant notamment l'évaluation fonctionnelle.

D'autre part le groupe 2 va permettre de confirmer l'existence d'une cinétique d'expression du transgène thérapeutique.

Les animaux seront injectés à l'âge de 2 mois et gardés 8 mois post-injection.

Des analyses exhaustives seront réalisées sur chaque animal afin d'évaluer l'efficacité du traitement à la fois aux niveaux moléculaire et histologique mais aussi phénotypique (évaluation de la locomotion) et immunologique.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon des procédures précises et déjà validées :

-Anesthésie pour l'injection intraveineuse et biopsies musculaires : anesthésie fixe de l'animal, puis relai gazeux après intubation endotrachéale : mélange d'isoflurane et d'oxygène. Pendant l'anesthésie les animaux seront monitorés (fréquence respiratoire, ECG, oxymétrie et capnographie).

-Traitement analgésique pour les biopsies musculaires chirurgicales qui seront réalisées à J0 (pré-injection) et à 3 mois post-injection pour les groupes 1 et 3 et à J0, puis 1 et 2 mois post injection pour le groupe 2 : Morphine en per-opératoire (en bolus de 0.1 mg/kg en IV lente ou SC au cours de la chirurgie, pouvant être répétées selon la douleur de l'animal au cours de l'acte chirurgical) et un anti-inflammatoire, le Meloxicam (0.1 mg/kg) per os pendant 5 jours, en post-opératoire.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner de la souffrance, l'état général de chaque animal sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liée à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront automatiquement fournies à un vétérinaire.

D'autre part les chiens seront hébergés et élevés en accord avec la réglementation en vigueur. Le centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les chiens. Ce programme regroupe un certain nombre d'activités qui sont suivies via un cahier d'enrichissement.

**8530** Le gène Mdr2 chez la souris (MDR3 chez l'homme) est exprimé au niveau de la membrane des hépatocytes dans le foie. La protéine correspondante a pour rôle de transporter les phospholipides vers la bile. Son absence entraîne une haute concentration en sels biliaires, qui endommagent les hépatocytes. Chez l'homme, les mutations dans le gène Mdr3 conduisent à développer la maladie PFIC3 (cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3). Les souris sans mdr2 (Mdr2<sup>-/-</sup>) développent une hépatite choléstatique dès 2 mois, suivie d'une fibrose à partir de 6 mois pour aboutir systématiquement à un carcinome hépatocellulaire au bout de 15 mois. Ce modèle mime parfaitement la progression d'une tumeur hépatique associée à l'inflammation chez l'homme. Il constitue donc un modèle idéal pour étudier étape par étape les mécanismes de la carcinogenèse hépatique, qui, malgré les progrès considérables des dernières années dans le domaine, ne sont encore pas entièrement élucidés.

Le foie des souris Mdr2<sup>-/-</sup>, prélevé à différents temps choisis pour leurs caractéristiques physiopathologiques spécifiques incluant l'hépatite, la dysplasie, la fibrose et le carcinome, servira à analyser les changements des propriétés des gènes par différentes technologies. Les connaissances de ces changements pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les molécules altérées dans les cellules cancéreuses.

Les prélèvements du foie seront effectués après mise à mort réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie. Le niveau de souffrance pour la souris est de degré léger.

La composition génétique, en l'occurrence la déficience pour le gène Mdr2, entraîne par elle-même le stress. Les souris Mdr2<sup>-/-</sup> développent une inflammation hépatique et finalement un carcinome hépatocellulaire qui sont des maladies du foie pénibles. Néanmoins, il n'a jamais été reporté que l'apparence physique des souris Mdr2<sup>-/-</sup> ni leur longévité soient très différentes par rapport aux souris type sauvage du même fond génétique dans les études publiées depuis la création de ce modèle en 1993.

Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, les méthodes de biologie moléculaire, de culture cellulaire, de modélisation bioinformatique seront également entreprises pour réaliser ce projet. Au total, 180 souris seront mises en expérimentation dans deux procédures de classe légère.

Les efforts seront entrepris pour soulager le stress. Les souris seront immédiatement mises à mort si elles montrent des signes de stress importants, notamment dans la phase terminale de carcinome hépatocellulaire. Après l'âge de 10 mois, nous pratiquerons au moins une fois par semaine la palpation de l'abdomen des souris pour examiner la taille des tumeurs (il n'a jamais été rapporté que les souris Mdr2<sup>-/-</sup> développent des tumeurs avant l'âge de 10 mois). Dès que les tumeurs seront palpables, nous mettrons à mort les souris. Il faut noter qu'à la différence de l'homme chez qui l'hépatocarcinome est étroitement lié à la mortalité, le cancer du foie n'est pas rapidement fatal pour les souris. En effet, les souris Mdr2<sup>-/-</sup> ont une durée de vie comparable à celle des souris type sauvage du même fond génétique.

**8531** Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin se composent de phases d'activités (« poussées ») d'intensité variable en alternance avec des phases de rémissions plus ou moins complètes et prolongées. Plus particulièrement, la maladie de Crohn présente des zones de fortes inflammations majoritairement au niveau du colon et de la partie distale de l'iléon. Cette maladie est progressive et destructrice au regard des dommages structuraux irréversibles qu'elle engendre avec la perte de certaines fonctions intestinales primordiales pour le maintien de l'homéostasie. Bien que l'établissement de la maladie de Crohn soit actuellement considérée par un ensemble de facteurs environnementaux (tabac, alimentation), génétiques et microbiens, il est apparu qu'une amélioration pouvait être obtenue par diminution du nombre de bactéries dans la lumière intestinale après une antibiothérapie ou un lavage de l'intestin. D'autre part, le groupe des proteobacteria et plus spécifiquement l'espèce *Escherichia coli* a semblé particulièrement impliquée dans l'établissement ou le prolongement des lésions intestinales.

Dans ce contexte, nous utiliserons un modèle murin de colonisation intestinale à l'aide de souches de *Escherichia coli* nous permettant de reproduire au mieux la situation cytokiniques observées lors de la maladie de Crohn. Bien que les tests *in vitro* apportent une réponse intéressante quant à l'utilisation de notre technologie pour l'élimination d'une population bactérienne particulière, nous devons démontrer son efficacité sur des temps allongés chez l'animal, limitant ainsi le risque de rechute au sein d'une population microbienne complexe qu'est le microbiote intestinal. Pour cela, nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1500 souris sur 3 ans de procédure de classe modérée.

Les bénéfices attendus pourraient être de premier ordre nous permettant d'obtenir une stratégie efficace de lutte contre ces maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sans pour autant affecter le reste du microbiote de part la spécificité de la technologie employée.

Ce projet pourrait occasionner de rares effets néfastes pour les animaux. Un stress ainsi qu'une sensation désagréable pourrait intervenir lors du gavage intra-gastrique, via des sondes adaptées, de la souche bactérienne ainsi que de la stratégie thérapeutique utilisée. Les souches *Escherichia coli* utilisées n'étant pas pathogènes pour les souris, aucun désordre intestinal ne devrait se révéler dans ce projet. Le niveau de sévérité attendu est donc modéré. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude afin d'observer l'aspect des tissus intestinaux. Bien évidemment, si des animaux infectés présentent des symptômes de maladie avancée (perte de poids, sang dans les selles), ils seront automatiquement mis à mort.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de tester une stratégie thérapeutique innovante fonctionnant parfaitement dans un milieu simple dans les conditions de laboratoire. De plus, le risque de rechute associé à la fin du traitement sera également analysé.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre connaissance de ce type d'études. Dans ce contexte, nous réfléchissons avant chaque expérience au nombre minimum



d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs sans affecter l'objectif fixé.

**8532** La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013- 118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent.

Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'aux personnes souhaitant maintenir leurs compétences techniques, la possibilité de réaliser des injections intracérébrales. Cette formation continue permet ainsi aux expérimentateurs de rester compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut nécessitant de la stéréotaxie dans les meilleures conditions pour les animaux.

L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement que chez la souris. En effet, la stéréotaxie est une technique d'injection qui permet d'atteindre des points précis dans le cerveau. Il s'agit donc d'une chirurgie qui ne peut être apprise autrement que sur l'animal.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, les animaux seront systématiquement des animaux de réforme. Nous estimons à 200 souris le nombre maximum nécessaire sur 5 ans pour assurer la formation pratique à la stéréotaxie.

Les injections stéréotaxiques seront réalisées sous anesthésie, avec une couverture antalgique adaptée. Du gel ophtalmique sera utilisé pour prévenir le dessèchement de la cornée et les souris seront placées sur un tapis chauffant jusqu'à leur réveil complet.

**8533** L'hémophilie A est une maladie génétique due à un déficit d'un facteur de la coagulation. Cette pathologie affecte environ 1 à 2 cas sur 10 000 naissances. Elle touche essentiellement les garçons en entraînant chez ces patients des épisodes de saignement sévère. Actuellement, le traitement principal est un traitement de substitution qui consiste à administrer dans le sang le facteur manquant de façon répétée. Dans plusieurs cas (30% des patients), le patient développe une réponse immunitaire contre le traitement, ce qui rend les injections répétées moins ou pas du tout efficaces.

Le but de notre projet est de tester de nouvelles molécules pour prévenir les saignements. Ces molécules inhibent une protéine, l'antithrombine, qui normalement ralentit la coagulation, afin d'avoir comme effet une accélération de la coagulation. Nous allons les apporter aux tissus chez la souris à l'aide de vecteurs viraux dérivés du virus adeno-associé (rAAV), qui sont des transporteurs de choix et permettent la production de ces molécules à long terme. L'avantage de notre stratégie sera donc liée à la possibilité de les utiliser chez les patients qui développent des anticorps contre le traitement habituel, et d'obtenir une efficacité durable qui évitera les administrations répétées. Une étude préliminaire réalisée dans un laboratoire avec lequel nous collaborons a déjà permis d'identifier une molécule montrant une efficacité thérapeutique. Dans notre étude, nous testerons de nouvelles formes dérivées de cette molécule.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts de la coagulation (impossibilité de mesurer la formation de caillot sanguin dans des modèles cellulaires : pas de remplacement possible). A l'opposé, les modèles murins permettent de tester la formation des caillots et l'effet bénéfique de nos molécules.

La production de nos nouvelles molécules a été testée en premier sur des cellules en culture, et seules les molécules les plus efficacement produites seront administrées aux souris, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Selon l'efficacité des molécules produites, ce type de criblage peut permettre d'économiser jusqu'à 168 souris.

Les molécules thérapeutiques seront véhiculées dans un tampon salin neutre et des échantillons de plasma seront récoltés périodiquement pour effectuer nos analyses. Afin de raffiner nos études, nous effectuerons des analyses multiples sur chaque échantillon et des analyses statistiques pour exploiter au mieux nos données. De plus, des point limites sont définis et les actions prises selon le niveau

atteint : si la souris atteint le niveau 2, elle sera soulagée par l'administration de molécules antidouleurs. Si le niveau 3 est atteint, les animaux seront sacrifiés.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 8 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront utilisées dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 2 ans et nécessitera l'utilisation totale de 280 souris.

**8534** Les protocoles décrits visent à étudier les mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer et de déterminer l'impact de facteurs modulateurs sur ces mécanismes. Ces études font appel à des modèles reproduisant les différentes lésions/anomalies retrouvées dans le cerveau des patients atteints par cette affection neurodégénérative ou processus considérés comme étant instrumentaux dans cette maladie. Les modèles sont générés par différentes approches transgéniques et virales. Ces expériences ont pour but de mieux comprendre la pathologie, d'en extraire des voies de modulation potentielles et in fine de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Ces expériences en voulant corréliser approches moléculaires et cognition doivent se faire dans des modèles appropriés *in vivo*. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole : 1) Raffinement : dans tous les protocoles, l'ensemble des procédures expérimentales sera réalisé en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés par la mise en place de période d'accoutumance et l'emploi d'anesthésiant et antalgique adaptés. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu. L'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi quotidien (attitude corporelle, aspect du pelage, poids corporel) de sorte à administrer un traitement anti-inflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites établis. 2) Réduction : Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables). 3) Remplacement : L'objectif de ce projet est d'évaluer différents aspects de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer en lien avec les performances cognitives. L'utilisation d'animaux vivants revêt donc un caractère de stricte nécessité. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre unité sur les 5 ans à venir est estimé à 8261 (8086 souris et 175 rats). Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limite spécifié pour chaque approche expérimentale sera sacrifié dans une salle dédiée; le tout en lien avec le responsable du bien être animal.

**8535** L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique provoque fréquemment des déficits moteurs sévères. Il est maintenant reconnu que l'évolution des déficits sensorimoteurs n'est pas exclusivement associée au volume lésionnel mais également à la plasticité observée dans les zones épargnées par la lésion. Cette plasticité peut s'étendre jusqu'à la moelle épinière. Les mécanismes de plasticité au niveau spinal pourraient contribuer à expliquer la récupération fonctionnelle post-ischémie cérébrale. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore identifiés. Le mécanisme ciblé ici fait référence à l'action des afférences musculaires metabosensibles (afférences des groupes III et IV) connues pour jouer un rôle dans la régulation de l'activité motrice au niveau de la moelle épinière et du cerveau, principalement en situation de fatigue. Les mécanismes impliquant ces afférences musculaires pourraient donc contribuer à expliquer la fatigue excessive observée lors des différentes tâches de la vie quotidienne chez les patients AVC. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité des afférences musculaires des groupes III et IV après une ischémie cérébrale et leurs actions dans la moelle épinière et au niveau de l'encéphale (thalamus) afin de cibler précisément les zones où leurs effets pourraient être altérés. Pour cela, des mesures électrophysiologiques *in vivo* seront réalisés chez des rats ayant subi une ischémie cérébrale ainsi que des mesures comportementales.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'impact d'une ischémie cérébrale sur l'activité spinale. Le rat est un modèle de choix car les

adaptations physiologiques au niveau musculaire et cérébral sont proches de ceux qui sont observées chez l'Homme.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 86 rats Sprague Dawley, mâles et femelles. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation du rythme respiratoire au niveau des flancs de l'animal), si le rat est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés.

Raffinement : Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les rats afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Par exemple, l'environnement des cages sera enrichi par la présence d'objets afin de réduire l'ennui des animaux. La nourriture (humidifiée) sera à disposition de l'animal directement dans la cage après l'ischémie cérébrale. De plus, les animaux seront anesthésiés au cours des enregistrements électrophysiologiques avec de la kétamine + xylazine (voir les détails plus bas). La température sera surveillée tout au long de l'enregistrement à l'aide d'un tapis chauffant en lien avec une sonde rectale pour maintenir la température appropriée. Lors des tests de comportement, le stress est réduit grâce à l'habituation des animaux à l'expérimentateur (toujours le même) et aux cages utilisées lors des tests.

**8536** Les contaminations chimiques dans les eaux douces et salées sont surveillées sur le territoire national, notamment pour éviter la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale. Les colorants, en particulier les triarylméthanés, font partie des substances à contrôler, car malgré le fait avéré qu'ils soient dangereux pour la santé humaine, ils continuent à être utilisés frauduleusement en aquaculture pour leurs propriétés antiseptiques et antifongiques. Ainsi, plusieurs colorants de la famille des triarylméthanés peuvent être détectés par la méthode d'analyse officielle. Cependant, il est nécessaire d'investiguer l'occurrence des résidus d'autres familles de colorants, qui étaient inconnus jusque-là ou presque, pour leur utilisation en aquaculture et qui pourraient nouvellement être utilisés. L'objectif de ce projet est de renforcer le dispositif de surveillance actuelle en augmentant le nombre de colorants recherchés en incluant une famille dérivée de celle des triarylméthanés, les « victoria blue ». L'étude du métabolisme *in vivo* de ces molécules est à présent nécessaire pour obtenir des données sur la cinétique d'élimination afin de déterminer le ou les résidus biomarqueurs d'exposition au traitement. Pour ce faire, deux procédures expérimentales sur poissons permettront d'obtenir ces données chez la truite arc-en-ciel exposée à une concentration non-létale de victoria pure blue BO et ainsi limiter les fraudes en aquaculture et assurer la sécurité alimentaire pour le consommateur. Les procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique ( $n= 98$  truites au maximum) et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux : volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, présence d'enrichissements dans le milieu et de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel est nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en toxicologie et que cette étude vient en complément d'une précédente approche *in vitro* sur microsomes de foies de truites. Enfin, des prélèvements de sang, foie et chairs de poissons contaminés seront effectués afin d'obtenir une évaluation complète de la cinétique d'élimination de la molécule parent et des principaux métabolites et de déterminer les biomarqueurs d'exposition les plus fiables.

**8537** Les volailles peuvent être sujettes à de nombreuses affections de l'appareil digestif, dont certaines peuvent être mortelles en l'absence de soins, qu'elles soient d'origine parasitaire, bactérienne, ou non infectieuses (par exemple provoquées par des mycotoxines). En particulier au niveau mondial, on estime à 3 milliards de dollars par an le préjudice économique causé par l'affection parasitaire qu'est la coccidiose. L'objectif de ce projet est de tester différentes stratégies permettant de valider des solutions efficaces de lutte contre ces différents agents pathogènes, voire, le cas échéant, de constituer une alternative efficace aux antibiotiques actuellement utilisés.

Dans le cadre de ce projet, mené sur des volailles (poulets, canards, dindes) car ces espèces sont particulièrement sensibles à ces maladies, une partie des animaux est mise en contact avec l'agent pathogène afin de reproduire la pathologie étudiée. Les critères retenus pour discriminer les différentes solutions sont le gain de poids, la consommation, l'efficacité alimentaire, la mortalité et la morbidité, ainsi que des critères d'anatomie pathologique ou de biochimie spécifiques des pathologies concernées. Les données de ce projet étant destinées aux différentes filières avicoles, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur chacune des espèces : poulets, dindes, canards, et ce sur les tranches d'âge correspondant aux périodes d'élevage habituelles respectives de ces espèces.

Dans le cas de certaines solutions testées, une sélection de produits pourra être faite au préalable par une méthodologie *in vitro*.

Cependant, l'efficacité *in vitro* ne garantit pas que le produit ait le même comportement dans le contexte du tube digestif, ce qui explique la nécessité de pouvoir valider l'action de ce produit sur les animaux.

Le projet aura une durée de 5 ans, impliquant au total 7750 volailles (6400 poulets, 960 canards, 390 dindes). Durant cette période, 15 essais seront réalisés, comprenant chacun entre 192 et 640 volailles. Pour chaque essai, 8 stratégies seront comparées. Cet effectif a été défini comme l'effectif minimal permettant d'identifier comme significatifs des écarts de performances en logements collectifs.

Les animaux sont logés en cases collectives, dans des conditions de logement similaires à celles rencontrées en élevage et dans le respect des obligations réglementaires qui y sont associées (en termes par exemple de densité ou de litière).

Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux est effectué, afin de détecter une éventuelle douleur ou souffrance des animaux (par exemple, un déficit de poids, ou encore une incapacité à se déplacer). Sur décision du vétérinaire, les animaux concernés sont soit retirés de l'étude et reçoivent un traitement adapté, soit sacrifiés.

En fin d'essai, les animaux seront écartés de la filière de consommation de viande.

**8538** Les troubles du développement sexuel (TDS) constituent un groupe important de maladies humaines avec plus d'un enfant sur 300 ayant des symptômes tels que les cryptorchidies et un sur 4000 présentant une inversion de sexe. Cependant les TDS restent inexplicables dans plus de 50% des cas. Cela est dû au fait que notre connaissance des réseaux génétiques contrôlant la détermination du sexe est encore limitée. L'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement des gonades est donc un objectif de la plus haute importance pour la compréhension des TDS.

Quelques gènes clés de la différenciation ovarienne et testiculaire ont été identifiés. Chez l'homme, les mutations de ces gènes induisent des pathologies d'inversion de sexe.

Malgré les progrès réalisés sur l'identification des gènes impliqués dans la détermination du sexe, on ne sait toujours pas à quel stade précis celle-ci a lieu, ce qui empêche l'identification des gènes clés qui contrôlent ce processus. Par ce projet, nous identifierons le stade précis de la détermination du sexe, ce qui nous permettra ensuite d'identifier les gènes clés nécessaires à la différenciation sexuelle de la gonade. Le phénotype attendu est l'inversion sexuelle qui n'est pas un phénotype dommageable. Trouver de nouveaux gènes diagnostics facilitant l'identification des TDS et ainsi d'améliorer l'efficacité des traitements.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), des techniques de culture de gonades ont été testées mais ont donné des résultats non conclusifs dus à des problèmes de dégénérescence des tissus. Ainsi, ces analyses doivent être réalisées sur des gonades *in vivo* en utilisant des souris génétiquement modifiées. Cependant si de nouvelles conditions de culture deviennent utilisables, nous les utiliserons dans la perspective de remplacement. Les modèles murins utilisés n'ont de phénotype dommageable. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteignons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations. Les conditions d'hébergement des souris seront optimisées avec un enrichissement du milieu dans un but de raffinement. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 330 souris. Certains TDS résultent de défauts de différenciation d'une de ces populations de cellules. Ce

projet permettra de comprendre comment les cellules acquièrent leur identité, ce qui est une première étape pour avancer dans l'étiologie de ces pathologies.

**8539** De nos jours, les exercices d'endurance sont reconnus comme bénéfiques pour tout type de population, c'est-à-dire de l'enfant à la personne vieillissante. L'exercice régulier joue un rôle préventif de nombreux troubles cardiovasculaires, neuromusculaires et cognitifs. L'entraînement en endurance le plus répandu est l'exercice prolongé d'intensité modérée (MOD) où l'intensité d'exercice utilisée ne provoque pas une fatigue rapide et d'induit pas d'accumulation de métabolites musculaires. Les gains de performance induits par ce type d'exercice deviennent de moins en moins importantes au bout de quelques mois seulement.

Pour éviter une stagnation des performances, il est fortement recommandé de réaliser des exercices fractionnés de haute intensité (High-Intensity Interval Training ; HIT) qui consistent en une succession de séries d'effort brefs (10 sec à 5 min) et intenses, séparées par des périodes de récupération. Cependant, les effets sur la performance ainsi que les répercussions physiologiques des différents exercices d'endurance, particulièrement au niveau cérébral, restent peu connus et très controversés. Ainsi, leur impact sur les fonctions cognitives n'est pas encore bien établi.

Par ailleurs, ces adaptations cérébrales seraient dépendantes des adaptations musculaires spécifiques à chaque exercice. Cependant, l'interaction muscle-cerveau reste peu étudié. Dans ce projet, nous allons donc comparer l'efficacité des HIT par rapport aux MOD sur l'évolution des paramètres physiologiques de la performance d'endurance ainsi que sur les adaptations musculaires et cérébrales chez des rats Sprague Dawley jeunes et âgés.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'impact d'un entraînement d'endurance au niveau musculaire et cérébral et qui puisse faire le lien entre ces 2 systèmes. Le rat est considéré comme un modèle de choix car les adaptations musculaires et cérébrales induites par l'entraînement sont proches de celles observées chez l'Homme.

Réduction : Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux pour chaque groupe, nécessaire à la réalisation d'un test statistique paramétrique, soit un total de 92 rats Sprague Dawley, mâles et femelles. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés respiratoires, s'il est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés.

Raffinement : Les méthodes utilisées sont soit non invasives soit sans réveil. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les rats afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Par exemple, l'environnement des cages sera enrichi par la présence d'objets afin de réduire l'ennui des animaux.

**8540** La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante et représente donc un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations chez les patients, avec une érosion osseuse et une déformation irréversible des articulations.

Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission. De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation (anti-TNFs, anti-IL17, ...). Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant prendre le relais ou remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas.

Un projet précédent a permis de mettre au point une nanoparticule nouvelle et efficace contre cette pathologie. Le présent projet vise à valider cette particule en vue d'un essai clinique pour remplacer ou seconder les médicaments actuels. Nous devons établir le mécanisme d'action et contrôler que la version clinique développée actuellement présente bien les mêmes propriétés que la version pré-clinique précédemment évaluée.

Cette étude comprend deux phases : I/ évaluation des formulations et détermination de la formulation optimale ainsi que ses modes d'administration et II/ Etude par imagerie de la biodistribution des

liposomes, de leur modes d'action et détermination de paramètres d'imagerie pour l'évaluation précoce des effets thérapeutiques. La phase I comporte deux parties : 1/confirmation des effets préventifs du traitement, et 2/ évaluation des possibles effets curatifs.

3 modèles de polyarthrite seront utilisés pour établir l'efficacité du produit. Un suivi très précis avec une évaluation de la douleur est mis en place pour éviter toute souffrance inutile aux animaux : Des points-limites ont été établis avec une grille d'évaluation de la douleur qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé implique le sacrifice de l'animal avant la fin de l'étude

Le nombre d'animaux a été limité au minimum pour obtenir une puissance suffisante. Des outils d'imagerie sont développés pour utiliser le maximum d'informations de manière non invasive et permettre de limiter encore plus le nombre d'animaux futurs.

Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations.

Au total 688 souris seront utilisées dans ce projet.

Les objectifs attendus sont le démarrage d'une étude clinique d'ici 2 à 3 ans.

**8541** Ce projet vise à étudier l'impact de deux hormones (la Neuromédine U et le glucagon) sur l'homéostasie glucidique dans le but d'identifier des cibles thérapeutiques des diabètes de types 1 et 2.

La dérégulation de l'homéostasie glucidique observée au cours du diabète s'accompagne d'une modification de la sécrétion des hormones produites par le tractus digestif dont la Neuromédine U (NMU). NMU a récemment été proposée comme traitement du diabète car elle peut diminuer la réponse glycémique durant un repas mais son mode d'action est controversé.

Le premier objectif est de caractériser dans des souris C57BL/6NRj les mécanismes par lesquels la NMU diminue la réponse glycémique et de vérifier son innocuité dans le cadre du traitement du diabète.

Les patients diabétiques (de type 1 ou 2) doivent être supplémentés en insuline afin de contrôler leur glycémie. Pourtant certains cas, le diabète est mal stabilisé ce qui coïncide avec la présence d'une quantité élevée de glucagon plasmatique. Cette hormone est normalement produite et sécrétée par les cellules  $\alpha$  du pancréas. Différentes études rapportent que des sujets pancréatectomisés, c'est-à-dire ayant subi une résection du pancréas, présentent une insulinémie nulle mais une glucagonémie détectable laissant penser qu'il existe une source extra-pancréatique de glucagon. Le précurseur du glucagon, le proglucagon, est également synthétisé par l'épithélium intestinal. En revanche, sa maturation est différente entre l'intestin (donnant du GLP1) et le pancréas (donnant du glucagon). Nous émettons l'hypothèse qu'après pancréatectomie l'intestin devient une source de glucagon.

Le second objectif est de montrer dans des souris C57BL/6NRj si l'intestin est une source extra-pancréatique de glucagon et si sa production est augmentée dans des modèles de diabète (pancréatectomie et régime hyperlipidique).

Les paramètres de l'homéostasie glucidique sont régulés via l'interaction synergique de l'intestin, du foie, du pancréas, du système nerveux central, des muscles et du tissu adipeux. Le modèle d'étude doit donc permettre une communication entre ces différents acteurs. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Ce projet de biologie intégrative nécessite donc l'utilisation d'animaux. Nous sommes en train de développer des cultures d'organoïdes pour favoriser le remplacement des modèles animaux dans le cas de questions extrêmement précises et se posant uniquement au niveau de l'intestin.

Nos conditions d'élevage limitent au mieux les variations physiologiques et nos expériences pilotes ont permis d'accéder aux moyennes de variations attendues de certains paramètres (% de gain ou perte de poids, glycémie à jeun, etc.). Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons réalisé des analyses statistiques afin de déterminer le nombre optimal (et donc minimal) d'animaux nécessaires par groupe pour observer une différence significative si elle existe avec un risque  $\alpha$  inférieur à 5% et un risque  $\beta$  inférieur à 10%. Un nombre d'animaux de 10 par groupe permettra d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Pour raffiner au mieux l'utilisation des animaux, un même groupe d'animaux sera analysé pour les mêmes paramètres en pré- et post-chirurgie puis post-mortem les tissus seront caractérisés en détails. Au moment du sacrifice de très nombreux organes seront prélevés pour être

analysés dans le cadre de ce projet mais également pour des projets en collaboration (pancréatite, stéatose hépatique et ...).

Le bien-être animal sera toujours une préoccupation majeure de ce projet. 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 afin de favoriser leur bien-être.

Pour les procédures qui nécessitent une chirurgie, l'opération a lieu sous anesthésie générale, induite et maintenue par isoflurane. Une administration locale de xylocaïne (antalgique) est effectuée avant la fermeture pour prévenir la douleur post-opératoire. Une injection intramusculaire de pénicilline G est effectuée juste après l'opération. Une nouvelle injection de xylocaïne est réalisée 6h plus tard si nécessaire. Un suivi clinique et une surveillance quotidienne des animaux seront réalisés avec la mise en place de critères de soulagement de la douleur au antalgique si nécessaire et de critères d'arrêt comme la perte de poids, la prostration etc. Les prélèvements de sang au niveau du sinus rétro-orbital sont réalisés sous anesthésie induite et maintenue par isoflurane.

Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 1500 souris.

**8542** La demande mondiale en viande de volaille est en augmentation depuis plusieurs années, elle devrait d'ailleurs croître de 20% entre 2015 et 2025 selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. L'objectif de ce projet est d'améliorer les connaissances concernant les besoins nutritionnels des volailles, afin de mettre en œuvre une alimentation efficace, optimisant les performances zootechniques de ces animaux. L'aliment peut en effet se définir comme un mélange de matières premières et d'additifs apportant les nutriments nécessaires à la croissance des animaux. Dans le cadre de ce projet, les performances des volailles (gain de poids, mesures de consommation et d'efficacité alimentaire) ainsi que certains critères sérologiques sont mesurés dans un dispositif en petites cases ou en cages. En effet, ces types de logement permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux mis en essai, en augmentant la puissance statistique du dispositif expérimental. Les animaux sont logés en collectif dans le but de favoriser les interactions sociales, et disposent de litière, afin de leur assurer un confort thermique et de leur permettre d'exprimer leurs comportements exploratoires de fouissage, grattage. La complexité des paramètres influant sur les besoins nutritionnels et leurs interactions ne permet pas d'une part d'utiliser uniquement des modèles alternatifs (modélisation, méthodes *in vitro*). D'autre part, la réponse à un régime alimentaire (digestion, absorption, utilisation, ...) est spécifique à chaque espèce. Les données de ce projet étant destinées aux différentes filières avicoles, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur chacune des espèces : poulets, dindes, canards, et ce sur les tranches d'âge correspondant aux périodes d'élevage habituelles respectives de ces espèces. Le projet aura une durée de 5 ans, impliquant au total 8800 volailles (4000 poulets, 4000 canards, 800 dindes), ce qui permettra de réaliser 6 essais, comprenant chacun entre 640 et 2800 volailles. Pour chaque essai, 6 à 10 stratégies seront comparées. Cet effectif a été défini comme l'effectif minimal permettant d'identifier comme significatifs des écarts de performances de croissance en logements collectifs. En fin d'essai, 95% des animaux rejoindront le circuit de consommation de viande.

**8543** Dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés, la myéline est formée par les oligodendrocytes (OL). Son rôle principal est d'augmenter la vitesse de l'influx nerveux. La myéline est altérée ou détruite dans plusieurs pathologies neurodégénératives, comme la sclérose en plaques (SEP) et la maladie de Parkinson, mais aussi dans les pathologies mentales/psychiatriques, telles que la dépression, l'autisme et la déficience intellectuelle. Chez l'adulte, la myéline possède des caractéristiques dynamiques et adaptatives. En effet, la myélinisation augmente au cours de l'apprentissage de tâches sensitivomotrices complexes et diminue suite à l'isolement social. Les mécanismes moléculaires sous-tendant cette plasticité dépendante de la myéline ne sont pas encore connus. Le remaniement du cytosquelette d'actine pourrait jouer un rôle critique dans cette régulation comme dans le cas de la plasticité synaptique par les épines dendritiques. De plus, le remodelage du cytosquelette d'actine pourrait également être crucial dans la réparation des lésions démyélinisantes dans des pathologies comme la SEP. La recherche fondamentale œuvre à caractériser de nouveaux facteurs impliqués dans les processus de myélinisation et remyélinisation. Cette recherche est importante dans la mesure où elle pourrait permettre d'identifier de nouvelles

cibles d'intérêt thérapeutique pour favoriser la régénération de la myéline dans les maladies démyélinisantes. Nous nous intéressons en particulier aux rôles fonctionnels de PAK1, une protéine qui est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dont les fonctions sont inconnues dans les oligodendrocytes. Nous nous focaliserons sur les fonctions de PAK1 dans : i) la remyélinisation du SNC dans un modèle murin de SEP ; ii) la plasticité de la myéline chez des animaux en isolement social et au cours de l'apprentissage moteur.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 425 animaux. Nous appliquerons la règle des 3R au cours de la réalisation de ce projet : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum au nombre permettant de générer des données statistiques fiables ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, nous réaliserons des expériences *in vitro* (culture cellulaire et organotypique) dans certaines parties du projet quand les données *in vitro* permettent de répondre à la question scientifique. Toutefois, les études *in vitro* et sur des animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; les souris représentent donc un des modèles les plus appropriés pour notre projet.

**8544** La shigellose, ou dysenterie bacillaire, est une maladie infectieuse d'origine bactérienne qui se caractérise par une gastro-entérite, plus précisément une rectocolite aiguë. Elle se transmet par voie féco-orale, principalement dans les pays en voie de développement à cause de mauvaises conditions d'hygiène. Chaque année, elle tue plus de 600 000 personnes dans le monde, essentiellement des enfants de moins de 5 ans. Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin commercialisé mais de nombreuses approches sont en cours d'étude. Cette maladie est due à des bactéries appelées shigelles réparties en quatre espèces (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*). *Shigella* est une bactérie à Gram négatif virulente infectant le colon humain et provoquant des diarrhées. Le cobaye est le seul modèle animal identifié pour tester l'infection colique par *Shigella*. Ce modèle qui reproduit les réactions inflammatoires de l'organe ciblé au cours de l'infection naturelle, à savoir le colon, doit remplacer à terme le modèle de l'anse iléale du lapin ciblant l'iléum. Le modèle consiste à administrer les bactéries par voie intra-rectale après anesthésie des animaux. L'analyse de la réponse induite est faite sur des échantillons de colon prélevés après mise à mort des animaux. Ce modèle sera utilisé pour identifier de nouveaux facteurs de virulence et étudier le rôle des neutrophiles dans la réponse inflammatoire. Pour l'identification de nouveaux facteurs de virulence, des souches mutées de *Shigella* seront inoculées et comparées à la souche sauvage. Au total, au cours des 5 prochaines années, 270 animaux seront utilisés dans le cadre d'une unique procédure. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous consultons un biostatisticien avant chaque expérience pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé. Ce projet occasionnera quelques effets néfastes pour les animaux (diarrhée, fatigue). Le niveau de sévérité attendu est modéré. Comme décrit précédemment, l'infection du cobaye par voie intra-rectale n'est pas létale et est naturellement résolue après 8 heures. Les infections sont réalisées sous anesthésie pour limiter la douleur subie par les animaux. Nous analyserons les réponses inflammatoires et destruction de la barrière épithéliale colique pour évaluer le caractère invasif et virulent des souches testées. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Le recours à l'animal est nécessaire car les modèles cellulaires d'infection de *Shigella* (cellules épithéliales, cellules immunitaires) ne rendent pas compte de la modulation des mécanismes de virulence de *Shigella* dans le contexte inflammatoire. Notamment, les neutrophiles se cultivent difficilement au laboratoire et meurent dans les 6 heures post-purification hors de l'organisme vivant. Les cobayes seront maintenus dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée. Si des animaux montrent des signes de souffrance, ils seront mis à mort.

**8545** Les maladies du système musculo-squelettique touchent une large proportion de la population, que ce soient des maladies génétiques affectant le développement et la croissance telles que les dystrophies musculaires et dysplasies osseuses, les cancers, les maladies dégénératives liées au vieillissement telles que l'ostéoporose et l'arthrose ou encore les défauts de régénération suite à un



traumatisme. Nos recherches visent à mieux comprendre le processus de régénération osseuse afin de mettre au point des applications thérapeutiques et d'améliorer la réparation.

Le but de nos projets est d'identifier les sources de cellules souches participant à la réparation osseuse, et grâce au développement de marqueurs génétiques chez la souris, de déterminer les mécanismes de recrutement et de différenciation des cellules souches osseuses pendant la régénération tissulaire normale ou pathologique.

Dans ce projet, nous utilisons un modèle murin de fracture du tibia réalisée sous anesthésie, afin d'étudier le rôle des cellules souches osseuses pendant le processus de régénération.

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur le rôle des cellules souches osseuses et les différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération osseuse, nous avons établi le nombre exact de groupes expérimentaux et d'échantillons nécessaires pour atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des trois R. Notre longue expérience dans ce domaine de recherche et dans l'utilisation des modèles murins nous permet de définir précisément le nombre minimum d'animaux (=180) nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de prélèvements et en regroupant les animaux contrôles. Toutes nos expérimentations sont pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie.

Les animaux reçoivent une deuxième dose d'analgésique après opération, et sont suivis quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

**8546** Notre projet a pour but de déterminer le rôle de l'immunité adaptative dans la défense antibactérienne pulmonaire dans un modèle murin d'infection bactérienne chronique. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) et *Staphylococcus aureus* (SA) sont les principales bactéries qui infectent les bronches des patients mucoviscidosiques adultes. Le rôle de la réponse immunitaire adaptative dans la défense antibactérienne pulmonaire reste mal compris.

La réponse immunitaire adaptative est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) et dans les structures lymphoïdes tertiaires (SLTs) présentes dans le poumon. Ces structures sont principalement composées d'amas lymphocytaires B centraux et d'une couronne lymphocytaire T en périphérie.

Le modèle d'infection bronchique chronique par le PA ou le SA chez la souris, développé par notre laboratoire, est adapté à l'étude des relations hôtes-pathogènes, des mécanismes de l'immunité innée et adaptative et notamment du rôle des SLTs.

Les données obtenues dans notre laboratoire indiquent que :

- les poumons de patients atteints mucoviscidose ou de dilatations des bronches non mucoviscidosiques contiennent de nombreuses SLTs autour des bronches.
- l'infection bronchique chronique par PA ou SA induit la formation de SLTs autour des bronches en 14 jours chez la souris.
- la déplétion en LB chez des souris infectées chroniquement n'augmente pas la mortalité ni la charge bactérienne pulmonaire et conduit à une désorganisation des SLTs.

Dans un premier temps nous étudierons le rôle des lymphocytes T (LT) sur le contrôle de l'infection pulmonaire chronique à SA ou PA. Nous évaluerons la survie des animaux, la charge bactérienne pulmonaire et la réponse immunitaire pulmonaire par analyse histologique et cytométrie en flux.

Dans un second temps, nous étudierons l'effet d'une déplétion combinée en LB et en LT sur le contrôle de l'infection, la survie et la réponse immunitaire pulmonaire par analyse histologique et cytométrie en flux.

Nous travaillerons sur des souris issues de la lignée C57Bl/6 de phénotype sauvage, lignée que nous utilisons depuis de nombreuses années et à partir de laquelle nous avons mis au point un modèle expérimental original d'infection pulmonaire chronique reconnu par la communauté scientifique et pertinent dans l'étude de la physiopathologie des dilatations des bronches.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'épargner le plus d'animaux possible tout en obtenant des résultats statistiquement satisfaisants : le nombre d'animaux nécessaires par groupe a été déterminé grâce à des études réalisées en amont. Nous prévoyons d'utiliser 300 souris. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Leur état général sera surveillé quotidiennement (poids, comportement, apparence). Des

antalgiques sont prévus si besoin et un niveau trop élevé de douleur entraînerait le sacrifice anticipé de l'animal.

La thématique de recherche de notre projet implique l'étude d'organismes vivants complexes (cellules immunitaires, cellules épithéliales...) et les renseignements apportés par ces études animales ne peuvent être obtenus par des techniques alternatives.

Ces données permettraient de progresser dans la compréhension des mécanismes de l'immunité antibactérienne lors de l'infection bronchopulmonaire chronique chez les patients mucoviscidosiques.

**8547** Ce projet a pour but d'étudier l'intérêt de l'ouverture de la barrière hémato-médullaire par un dispositif d'ultrasons non focalisés dans la maladie de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic sans qu'aucun traitement n'existe à ce jour.

La barrière hémato-médullaire est un filtre naturellement présent empêchant le passage des médicaments vers les neurones touchés par cette pathologie. Or, on sait qu'il est possible grâce à des ultrasons d'ouvrir pour 6 heures cette barrière.

Pour étudier cette maladie, nous utilisons des modèles de souris SLA afin de tester si l'ouverture transitoire permet de mieux faire passer des médicaments prometteurs. Nous étudierons également le bénéfice de cette ouverture sur le système immunitaire.

Dans ce projet, nous allons suivre différents groupes de souris, avec ou sans ultrasons, avec ou sans médicament. Nous espérons une augmentation de la survie des souris traitées par ultrasons. Ce projet nécessitera 40 souris saines et 80 souris modèle SLA donc, un nombre total de 120 souris pour une durée de 5 ans.

Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de réduction, remplacement et raffinement (3Rs). Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Cependant, dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées et avons, pour chaque procédure, défini un point limite. Un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

**8548** L'incidence des maladies rénales chroniques (MRCs) est en progression constante et représente actuellement un véritable fardeau pour la santé publique. La lutte contre le développement de cette maladie est un des principaux enjeux médicaux de notre époque. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 2,5 millions de personnes et représentent 2% des dépenses d'assurance maladie. Malgré les progrès accomplis par la médecine moderne les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces, d'autant plus que les MRCs sont en augmentation constante de 3% pour les patients dialysés et de 5% pour les patients greffés chaque année.

Le but de ce projet est d'étudier le rôle d'une nouvelle voie de signalisation impliquée dans le développement des MRCs en utilisant la souris comme modèle animal. A ce jour, il n'est pas encore possible d'éliminer l'expérimentation animale pour étudier la physiologie et la pathophysiologie des organes majeurs tels que le rein. Bien que certains aspects physiologiques puissent être étudiés *in vitro*, il est toujours difficile d'extrapoler les résultats de ces analyses à une situation plus complexe dans laquelle un organe fonctionne dans son milieu naturel. Nous disposons ainsi de différents modèles de néphropathies expérimentales murines bien caractérisées qui nous permettront de tester l'importance de cette nouvelle voie de signalisation *in vivo*.

Nous planifions 1) d'invalider cet axe de signalisation *in vivo* en générant des souris génétiquement modifiées et 2) de soumettre ces souris invalidées à des modèles de néphropathies expérimentales. Nous espérons ainsi bloquer le développement et la progression de l'insuffisance rénale *in vivo*. Afin de d'étudier le potentiel thérapeutique de cette nouvelle voie de signalisation, nous avons établi trois

différents modèles de néphropathie applicable à 780 souris génétiquement modifiés durant une période de 3 ans. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux et de respecter la règle des " 3 R ". Afin de garantir le bien-être animal, une surveillance quotidienne et le recours à des analgésiques sont prévus.

Nous espérons que notre recherche permettra de mieux comprendre la progression de ces maladies chronique de dégénérescence rénale et d'ouvrir la voie au développement de nouvelles cibles thérapeutiques.

**8549** Les cellules souches ont la capacité remarquable de s'autorenouveler et de se différencier pour donner naissance à des cellules spécialisées. Au sein des organismes adultes, des cellules souches ont été identifiées dans différents tissus dont la peau, le cerveau, l'intestin ou le sang (tissu hématopoïétique), et sont nécessaires au renouvellement de ces tissus. L'équilibre entre prolifération et différenciation des cellules souches adultes doit être finement régulé, puisqu'une différenciation accrue ou à l'inverse, un excès de prolifération peuvent être délétère pour le tissu et l'organisme entier. La compréhension des mécanismes qui contrôlent cet équilibre est un des enjeux majeurs de la recherche biomédicale actuelle, puisqu'elle permettrait des avancées à la fois dans les domaines du vieillissement, du cancer ou encore de la médecine régénérative.

Le but de cette étude est de comprendre comment des variations dans production de ribosomes régulent le choix entre prolifération et différenciation des cellules souches. Pour cela, nous avons développé des souris permettant l'invalidation conditionnelle du gène Notchless (Nle) chez la souris adulte, gène essentiel pour la maturation du ribosome. Nous utiliserons des souris transgéniques dans lesquelles la mutation de Nle peut être induite, afin d'étudier les conséquences des altérations de la production des ribosomes sur la prolifération, la survie, l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et intestinales. Une partie de l'étude sera effectuée sur des modèles cellulaires que nous avons générés. Cependant, aucun protocole ne permet à ce jour la culture à long terme de cellules souches adultes. Le recours à l'animal apparaît donc comme incontournable pour définir les mécanismes de régulation propres à ces cellules. Les résultats attendus de cette étude sont d'une part une meilleure compréhension de la biologie des cellules souches adultes et d'autre part l'identification de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter des pathologies humaines impliquant des dérégulations de l'homéostasie tissulaire.

Sur une période de cinq ans, nous prévoyons l'utilisation de 1800 souris adultes dans 3 procédures de classe légère. Le nombre de souris utilisé est basé sur un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes. Les procédures mises en œuvre (injections de produits indolores) n'occasionneront qu'une gêne légère et transitoire pour les animaux.

Les animaux sont observés régulièrement. Les substances injectées sont indolores. Toutefois, si des signes cliniques (dos vouté, poils hérissés) se manifestaient, les animaux seraient sacrifiés.

**8550** De nombreuses molécules thérapeutiques injectables utilisées dans le traitement des cancers ou de maladies métaboliques ont l'inconvénient d'être éliminés rapidement par l'organisme (durée de demi-vie de l'ordre de quelques heures), ou encore de provoquer des réactions immunitaires de type allergique après injections répétées.

Les produits qui vont être testés consistent en l'encapsulation de molécules thérapeutiques à l'intérieur des globules rouges comme l'asparaginase et la méthioninase. Cette encapsulation permet ainsi leur protection et augmentant leur durée de vie.

L'asparaginase et la méthioninase détruisent dans le plasma sanguin respectivement l'asparagine et la méthionine, des acides aminés essentiels à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses. L'asparaginase est notamment utilisée dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).

La voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 est connue pour jouer un rôle clé dans le processus d'adaptation à une carence en acides aminés. Afin de pouvoir étudier le rôle joué par cette voie de signalisation au niveau de l'animal entier, nous avons généré une lignée de souris transgénique bioluminescente appelée AARE-LUC qui exprime le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de séquences de fixation (AARE) et du facteur de transcription ATF4.

Les travaux réalisés dans ce projet visent à évaluer l'impact dans les différents tissus/organes de certaines molécules thérapeutiques encapsulées comme l'asparaginase et la méthioninase sur l'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 une fois injectées par intraveineuse chez la souris AARE-LUC. Les résultats obtenus pourront permettre d'envisager par la suite de développer des médicaments pouvant permettre un traitement optimisé des patients atteints de cancers ou de maladies métaboliques.

Le principal bénéfice attendu de ces études est d'améliorer la compréhension du mécanisme d'actions de ces molécules thérapeutiques encapsulées dans les globules rouges.

Ce projet, qui va impliquer 240 souris sur une période de 2 ans, sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement) :

- Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction).

- Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis (Raffinement). Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager et ne nécessiteront qu'une contention légère. 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...). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, consommation..) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués. Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il sera examiné par un vétérinaire, et si nécessaire anesthésié puis sacrifié.

- Ces expériences vont permettre de valider l'impact des molécules thérapeutiques encapsulées dans les globules rouges sur l'organisme entier (Remplacement).

**8551** Les leucodystrophies représentent un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant primitivement la substance blanche du système nerveux central (SNC) et son principal constituant, la myéline. Parmi elles, le syndrome CACH /VWM (Childhood Ataxia with Central Nervous system Hypomyelination/ Vanishing White Matter) est caractérisé par (i) une dégradation neurologique survenant entre 2 et 5 ans exacerbée par des épisodes de stress (infections virales ou traumatismes crâniens) aboutissant au décès en 2 à 5 ans, (ii) un aspect oedémateux et cavitair de l'ensemble de la substance blanche cérébrale (Vanishing white matter, VWM). Les examens neuropathologiques mettent en évidence des anomalies des cellules gliales : hypomyélinisation contrastant avec une prolifération des oligodendrocytes immatures et paucité des astrocytes. Des mutations dans les 5 gènes codant les sous unités d'un facteur d'initiation de la traduction protéique, ubiquitaire, EIF2B (eukaryotic initiation factor 2B) ont été mises en évidence dans le syndrome CACH comme dans des formes plus modérées ou congénitales de leucodystrophies avec aspect de VWM. Il n'existe pour le moment aucune approche thérapeutique permettant d'empêcher ou de retarder le développement de la maladie et son issue fatale en quelques jours ou années. Dans le cas des maladies du SNC il est impossible d'obtenir des prélèvements du tissu atteint avant le décès du patient. Les seules informations concernant l'évolution de la maladie sont obtenues par des méthodes d'imagerie *in vivo* (IRM) qui ne permettent pas d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires en cause. Dans le syndrome CACH/VWM la question principale est de comprendre comment des mutations d'un facteur ubiquitaire de la traduction peuvent conduire à des anomalies sélectives des cellules gliales. Les études *in vitro* à partir de fibroblastes de patients atteints associées à celles de cerveaux post mortem suggèrent un trouble de la maturation des cellules gliales. Afin de mieux comprendre *in vivo* et au cours des différents stades de développement les mécanismes en cause, un modèle animal robuste et fiable est devenu nécessaire. Pour cela notre équipe a développé des souris transgéniques avec inactivation inductible du gène EIF2B5 (cKO EIF2B). Notre choix s'est porté sur l'inactivation du gène eif2b5, car il s'agit du gène le plus fréquemment muté en pathologie humaine. L'inactivation du gène eif2b5 dans l'ensemble de l'organisme étant létale un modèle d'inactivation inductible était indispensable. L'inactivation d'EIF2B5 est ainsi obtenue par traitement des souris au tamoxifène (molécule pharmaceutique activant l'excision du gène) dans des tissus spécifiquement ciblés (souris Cre-Lox). Ce projet vise à étudier les conséquences de l'inactivation du gène eif2b5 spécifiquement dans les astrocytes ou les oligodendrocytes à différents stades cruciaux du développement de la substance blanche (myélinisation) afin d'en comprendre l'impact en pathologie humaine.

Pour cette partie du projet nous utiliserons un total de 60 souris : dans un premier temps 2 groupes de 10 souris PLP-Cre-ERT2-cKOeif2b5 femelles adultes de 2 mois chacun (total de 20 souris : 10 souris injectées Tamoxifen + 10 souris injectée huile de Maïs) puis dans un second temps sur 2 autres groupes de 10 souris femelles adultes (comme les deux premiers groupes) selon les résultats obtenus des 2 premiers groupes, seront testés par condition expérimentale : injection tamoxifen v/s injection huile maïs.;

la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement) a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée de manière continue :

- Réduction, nous utiliserons le moins de souris possibles tout en veillant à obtenir des données statistiques significatives ;

- Raffinement, nous veillerons à optimiser les méthodologies pour éviter tout inconfort / douleur / détresse / angoisse aux animaux. Afin de préserver au mieux le bien être d'animaux, une attention constante sera déployée pour assurer la qualité des conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des souris (période d'acclimatation, soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité de locaux d'expérimentation);

- Remplacement, les études *in vitro* à partir des cellules gliales ne permettent pas l'examen de fonctions cognitives et motrices complexes. Néanmoins, nous développerons certaines expériences sur des tranches de tissus qui pourraient permettre d'évaluer morphologiquement ces cellules, diminuant ainsi le nombre des souris dédiées à des études histologiques.

**8552** Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une maladie rénale qui touche enfants et adultes, dont les mécanismes sont inconnus. Nous avons découvert l'implication de l'Isthmine-1 (ISM1) dans le développement de cette maladie, une protéine dont le rôle est encore inconnu dans la physiopathologie rénale. Nous avons montré dans un premier temps, que cette protéine était exprimée dans le rein, précisément dans les cellules qui sont la cible de la maladie (SNI). Dans un second temps, nous avons découvert que l'expression de l'ISM1 était augmentée dans le plasma des adultes et des enfants souffrant de SNI. Ce résultat très intéressant suggère que l'ISM1 pourrait être un nouveau marqueur du SNI.

De manière à approfondir les connaissances à la fois sur le SNI et sur l'ISM1, nous souhaitons développer des modèles animaux qui s'approchent le plus possible de la maladie humaine. Des études *in vitro* complémentaires permettront d'étudier le mécanisme d'action cellulaire de l'ISM1 mais pour mimer au mieux le contexte pathologique nous ne pouvons nous passer d'études *in vivo*. Le syndrome néphrotique est une maladie non douloureuse que l'on apprécie en mesurant la quantité de protéines dans les urines qui sont recueillies par l'utilisation de cage métabolique sans traumatisme pour les animaux. Il y aura peu de manipulations douloureuses chez les animaux en dehors d'injection d'ISM1 par voie intraveineuse sous anesthésie gazeuse ou autres injections par voie intrapéritonéale.

Le nombre d'animaux utilisés dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux et de respecter la règle des " 3 R ". La méthode de substitution consiste à utiliser des cultures de podocytes plutôt que des animaux pour étudier le rôle cellulaire et les voies de signalisation de l'ISM1. Afin de garantir le bien-être animal, une surveillance quotidienne et le recours à des analgésiques sont prévus.

Notre objectif est triple :

- (i) démontrer que l'injection d'ISM1 chez les souris induit une modification de la filtration rénale. (3 groupes de n=10 souris et expérience répétée une fois soit un total de 60 souris) sur des temps courts allant de 24 à 48h.

- (ii) développer et étudier une souche de souris transgéniques qui reproduit la maladie humaine, qui a la particularité d'exprimer fortement et spécifiquement l'ISM1 dans les cellules inflammatoires circulantes (n = 140 souris)

- (iii) évaluer le rôle de l'ISM1 des rats Buffalo/Mna qui développent spontanément un syndrome néphrotique (n=80 rats).

Nous faisons l'hypothèse que l'ISM-1 circulante agit comme un facteur de perméabilité et induirait le principal symptôme de la maladie, c'est à dire l'augmentation de la quantité de protéines dans les urines.

**8553** Enormément d'études en neurobiologie utilisent des souris pour tester des substances ou comprendre les mécanismes cérébraux, notamment grâce à des tests comportementaux. Mais si la souris est largement utilisée dans des conditions d'hébergement standards et dans des paradigmes comportementaux tout aussi standards, nous ne savons quasiment rien sur la vie des souris dans un environnement plus proche de leur habitat naturel, un environnement qui leur permettrait d'exprimer une grande partie, sinon l'intégralité de leur répertoire comportemental. Connaître ce répertoire comportemental plus complet nous permettra de mieux comprendre ce modèle largement utilisé et donc, par la suite, de raffiner les tests comportementaux classiques pour caractériser plus finement les aspects développés dans les différentes études.

Notre protocole d'hébergement / test dans un environnement complexe présenté ci dessous tentera de mieux comprendre l'organisation sociale, les processus de prise de décision et l'addiction à plusieurs drogues d'un groupe de souris avec une approche éthologique. Le suivi de chaque souris est possible grâce à l'implantation d'une puce RFID en sous-cutané dans le dos. Ainsi, chaque fois qu'un animal passe à un endroit stratégique, une antenne RFID capte son passage. Nous avons créé une base de données afin de récolter et d'exploiter les données issues de notre système. Nous pourrons ainsi connaître l'activité de chaque souris sur de longues périodes, la composition des différents sous-groupes de souris et leurs localisations dans le système. Nous filmerons également régulièrement le système afin d'observer le comportement des souris. Des tests comportementaux classiques seront également effectués. Les résultats de ces expériences seront mis en parallèle avec ceux collectés sur des souris hébergées en conditions standard. Au cours des 5 années sur lesquelles ce projet court, nous utiliserons 782 souris, comprenant des animaux type sauvage de la lignée C57Bl/6, mais aussi des animaux KO (Knock-out) invalidés pour des gènes codant des sous-unités de récepteurs nicotiques (associés à la prise de décision et au phénomène d'addiction). Les différences de résultat entre les souris type sauvage et les KO nous permettront de mieux comprendre l'implication des gènes invalidés dans les processus de prise de décision et d'addiction. Les groupes d'animaux testés seront définis de manière à réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats robustes, dans les deux types de conditions. Les animaux vivront dans un milieu complexe (complexité sociale et physique) proches des conditions de vie naturelle de la souris : ce milieu est un environnement enrichi et donc stimulant pour les animaux (raffinement), contrairement aux environnements standards plus pauvres. Cette nouvelle approche permettra en outre de réduire au minimum le stress lié aux manipulations des animaux et aucune souffrance ne sera générée, l'expérience étant totalement non-invasive.

**8554** La Glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie rare considérée comme un modèle de maladie auto-immune spécifique d'organe qui atteint les glomérules rénaux, principale unité de filtration du sang et de formation de l'urine. Elle est déclenchée par la fixation d'anticorps à des constituants de la membrane basale glomérulaire conduisant à une cascade d'évènements dont l'activation dérégulée du système du complément entraînant des lésions glomérulaires et une perte de fonction du rein.

Du point de vue clinique, la GEM est la cause la plus commune de syndrome néphrotique (perte urinaire massive de protéines) chez les adultes Caucasiens. La GEM a une prépondérance masculine (2 hommes pour une femme) avec un âge d'apparition entre 40 et 50 ans. Cette maladie est rare chez l'enfant, représentant moins de 5% des biopsies réalisées pour le diagnostic. Environ un tiers des patients atteints de GEM connaîtront une rémission spontanée de leur syndrome néphrotique. Cependant, un nombre significatif de patients ont une réponse faible aux thérapies immunosuppressives et entreront en stade final de la maladie rénale. 40% des patients greffés développeront à nouveau une GEM, cause de la perte du greffon. Les traitements par des médicaments coûteux et potentiellement toxiques restent controversés. Les futures stratégies devront être à multi-effets bloquant la production d'anticorps, inhibant la formation du Complexe d'Attaque Membranaire (CAM) au site d'agression podocytaire et protégeant le podocytes des lésions.

L'objectif de ce travail est d'identifier des molécules capables d'inhiber le complément et ses effets pour préserver l'intégrité des glomérules. Pour cela, l'équipe a développé un modèle cellulaire *in vitro* permettant le criblage à haut débit de collections de composés chimiques. Ceci a permis d'identifier

de nouveaux agents thérapeutiques potentiels. L'efficacité *in vivo* des composés ainsi retenus doit maintenant être évaluée *in vivo* chez l'animal. Tous ces composés sont issus d'une chimiothèque de molécules déjà approuvées par la « United State Food and Drug Administration » nous dispensant d'études de toxicité lourde.

Nous voulons donc déterminer la dose et la voie d'injection les plus efficaces de chacune des 4 molécules candidates pour bloquer l'activation du complément *in vivo* chez le rat Sprague Dawley. En effet, le modèle de glomérulonéphrite extramembraneuse que nous comptons utiliser par la suite, appelé néphrite de Heymann, a été développé dans cette espèce. C'est le modèle animal de glomérulopathie à dépôts immuns le plus abouti. Il est étudié depuis les années 1980 et nous l'avons déjà utilisé avec succès dans le laboratoire.

Pour cette étude, 80 rats Sprague Dawley seront nécessaires et répartis dans les différents groupes expérimentaux en regard d'un nombre limité de rats contrôles via leur mutualisation pour plusieurs conditions. De plus, la détermination de la dose et voie d'administration les plus efficaces pour chaque composé avant de mettre en place l'essai thérapeutique dans le modèle de néphrite de Heymann permettra de réduire encore le nombre de rats nécessaires à cette étape.

Enfin, des conditions d'hébergement en milieu enrichi (litière de fibres de cellulose blanche et carrée, buches de peuplier) et la limitation au maximum de la douleur et du stress des animaux durant les procédures expérimentales sont mises en place.

**8555** L'ataxie de Friedreich est une pathologie humaine d'origine génétique entraînant des troubles cardiaques et neurologiques majeurs.

L'origine génétique est documentée et se centre sur l'expression d'une protéine : la Frataxine (FXN). La perte d'expression de cette protéine est ainsi responsable de troubles cellulaires entraînant la pathologie.

REPLACEMENT : Afin de mettre en place des thérapies pour cette pathologie, des modèles murins ont été développés de manière ciblée, visant à cibler les différentes aires thérapeutiques (cardiaque, système nerveux central.). L'utilisation de souris se justifie ici d'une part par l'existence de modèles reproduisant la pathologie humaine et d'autre part par l'impossibilité de mener ces études *in vitro*.

Dans ce projet, nous nous intéresserons à une mutation ciblée du gène permettant la synthèse de FXN dans les cellules cardiaques. Ces animaux présentent une mortalité liée à un défaut du système cardiaque dès l'âge de 8 semaines.

Une thérapie génique est en cours de développement par l'un de nos partenaires et une première étude pilote visait à valider la dose nécessaire pour permettre d'exprimer à nouveau la protéine dans les cellules mutées.

Dans un premier projet, nous avons réussi à mettre en évidence un effet thérapeutique et donc à traiter les symptômes cardiaques observés chez les animaux mutants afin d'empêcher la dégradation de leur état classiquement observée. Le traitement consiste dans l'injection de vecteur visant à exprimer la frataxine dans les cellules déficientes.

Dans ce nouveau projet, nous cherchons à définir la dose la plus efficace pour empêcher l'apparition ou réduire l'impact des phénotypes dommageables.

Le projet s'articulera sur deux axes :

A) empêcher l'apparition des symptômes : le traitement sera administré avant l'apparition des symptômes (projet préventif)

B) traiter les symptômes déjà présents : le traitement sera administré après l'apparition des symptômes (projet symptomatique). Plusieurs études seront menées afin de trouver la dose efficace.

REDUCTION : lors des études, les groupes seront de 12 animaux pour un total de 233 souris au total (84 souris seront utilisées pour chaque projet (60 souris dans les groupes et 24 souris en pré-symptomatique), soit un total de 168 puis 65 animaux pour le protocole final). L'effectif de 12 animaux par groupe est optimal afin d'avoir des résultats statistiquement pertinents.

RAFFINEMENT :

Le protocole se poursuivra jusqu'à l'âge de 8 semaines (préventif) ou 15 semaines (symptomatique), date à laquelle les animaux mutés présentent un risque de souffrance/mortalité.

Dans le cadre du protocole symptomatique, les animaux du groupe mutant non traités seront sacrifiés de manière précoce. En effet, passé l'âge de 9 semaines, la mutation présente dans les animaux

peut entraîner une faiblesse puis une mortalité. Un suivi spécifique sera mis en place pour conserver ce groupe dans des conditions éthiques, tout en permettant leur analyse afin de disposer d'un contrôle dans l'évolution des symptômes.

Dans les groupes mutés traités, une surveillance de leur état de santé sera pratiquée de manière accrue passé l'âge de 8 semaines, afin d'éviter toute souffrance liée à une inefficacité du traitement et des points limites éthiques sont mis en place qui pourront guider une mise à mort pour raison éthique le cas échéant.

Un suivi de la fonction cardiaque sera effectué avant la traitement, puis surveillé toutes les deux semaines, par échographie.

Un suivi quotidien de l'état des animaux sera aussi effectué pour s'assurer de leur bien-être, ainsi qu'un suivi de poids hebdomadaire.

L'échographie et les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie gazeuse pour minimiser autant que possible la souffrance ou le stress des animaux.

**8556** Contexte scientifique : Les mammifères ont optimisé des moyens sensoriels de pilotage de leurs nouveau-nés vers la source nourricière, le lait. Ces moyens sensoriels reposent essentiellement sur l'aptitude des nouveau-nés à détecter des signaux olfactifs émis dans la zone mammaire et plus particulièrement dans le lait. Les travaux antérieurs réalisés dans notre équipe, chez différentes espèces de mammifères, humains ou non humains, ont permis de mettre en évidence l'aptitude des nouveau-nés à réaliser, en présence de l'odeur du lait de leur espèce, une chaîne comportementale aboutissant à la tétée (recherche de la tétine, mise en bouche, succion). Chez la souris, nous avons également pu mettre en évidence la capacité des nouveau-nés à exprimer une attraction plus ou moins intenses envers l'odeur de laits ayant différentes caractéristiques génétiques (provenant de différentes souches de souris) ou physiologiques (provenant de femelles à différentes périodes de lactation). Ce projet a donc pour objectif d'identifier chez la souris le ou les composés chimiques volatiles présents dans le lait i) qui permettent d'expliquer ces réponses différentielles du souriceau et surtout ii) qui participent activement à l'initialisation de la tétée.

D'un point de vue méthodologique, il s'agira dans un premier temps de réaliser des traites de souris femelles allaitantes i) provenant de différentes souches de souris ii) à différents moments de la lactation et iii) soumis à différents régimes alimentaires. Puis, dans un deuxième temps, il s'agira d'analyser la composition chimique de la fraction volatile de ces laits afin de rechercher i) la ou les molécules invariantes (présentes dans tous les laits) et donc potentiellement à l'origine de l'attraction de tous les laits de l'espèce et ii) la ou les molécules plus représentative de chaque souche ou de chaque période de la lactation. Enfin, dans un troisième temps, il s'agira de proposer ces chémosignaux olfactifs à des souriceaux, aux cours de 2 tests comportementaux en lien avec le contexte de tétée, afin de déterminer le ou lesquels participent activement au déclenchement des comportements de recherche et de saisie de la tétine. 800 souris et souriceaux participeront à ce projet.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, la réduction puisque le nombre de souriceaux testés par groupe sera dans un premier temps réduit au maximum puis éventuellement augmenté si une tendance statistique a besoin d'être confirmée. D'autre part la procédure expérimentale n'étant ni douloureuse, ni invalidante, les animaux pourront être conservés pour les besoins de l'élevage ou pour participer à un autre projet. Concernant le raffinement, la procédure de collecte des laits et les tests comportementaux sont pensés dans le but de réduire au maximum le stress des animaux (sous anesthésie pour les traites, environnement thermo-régulé pour collecte et tests comportementaux). Enfin, ce projet étudiant les mécanismes impliqués dans la communication précoce entre la mère et le nouveau-né chez les mammifères, la règle de remplacement n'est ici pas envisageable.

**8557** Notre projet a pour but d'étudier les mécanismes conduisant à la persistance des structures lymphoïdes tertiaires pulmonaires induites par l'infection chez des animaux déplétés en lymphocytes B (LB).

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) et *Staphylococcus aureus* (SA) sont les principales bactéries qui infectent les bronches des patients mucoviscidosiques adultes. Le rôle de la réponse immunitaire



adaptative dans la défense antibactérienne pulmonaire reste mal compris. La réponse immunitaire adaptative est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) et dans les structures lymphoïdes tertiaires (SLTs) présentes dans le poumon. Ces structures sont principalement composées d'amas lymphocytaires B centraux et d'une couronne lymphocytaire T en périphérie. Le modèle d'infection bronchique chronique par le PA ou le SA chez la souris, développé par notre laboratoire, est adapté à l'étude des relations hôtes-pathogènes, des mécanismes de l'immunité innée et adaptative et notamment du rôle des SLTs. Les données obtenues dans notre laboratoire indiquent que :

- les poumons de patients atteints mucoviscidose ou de dilatations des bronches non mucoviscidosiques contiennent de nombreuses SLTs autour des bronches.
- l'infection bronchique chronique par PA ou SA induit la formation de SLTs autour des bronches en 14 jours chez la souris.
- la déplétion en LB chez des souris infectées chroniquement n'augmente pas la mortalité ni la charge bactérienne pulmonaire et conduit à une désorganisation des SLTs.
- les poumons de patients mucoviscidosiques traités par Rituximab® (un anticorps monoclonal anti-CD20+, déplétant en LB) contiennent toujours des SLTs matures.

Nous étudierons l'effet d'une déplétion lymphocytaire B secondaire chez des souris infectées chroniquement par le PA ou le SA depuis 14 jours. Nous évaluerons la survie des animaux, la charge bactérienne pulmonaire et la réponse immunitaire pulmonaire par analyse histologique et cytométrie en flux.

Nous travaillerons sur des souris issues de la lignée C57Bl/6 de phénotype sauvage, lignée que nous utilisons depuis de nombreuses années et à partir de laquelle nous avons mis au point un modèle expérimental original d'infection pulmonaire chronique reconnu par la communauté scientifique et pertinent dans l'étude de la physiopathologie des dilatations des bronches.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'épargner le plus d'animaux possible tout en obtenant des résultats statistiquement satisfaisants : le nombre d'animaux nécessaires par groupe a été déterminé grâce à des études réalisées en amont. Nous prévoyons d'utiliser 280 souris. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Leur état général sera surveillé quotidiennement (poids, comportement, apparence). Des antalgiques sont prévus si besoin et un niveau trop élevé de douleur entraînerait le sacrifice anticipé de l'animal.

La thématique de recherche de notre projet implique l'étude d'organismes vivants complexes (cellules immunitaires, cellules épithéliales...) et les renseignements apportés par ces études animales ne peuvent être obtenus par des techniques alternatives.

Ces données permettraient de progresser dans la compréhension des mécanismes de l'immunité antibactérienne lors de l'infection.

**8558** La souche de souris C57BL/6N est la plus fréquemment utilisée pour la création de lignées génétiquement modifiées. Elle a été notamment choisie par l'International Knockout Mouse Consortium (IKMC), car elle était génétiquement proche de la souche C57BL/6J, très utilisée pour les études comportementales, tout en permettant un plus haut taux de succès des modifications génétiques. Néanmoins, des différences entre ces deux souches ont progressivement été décrites. Une mutation, dite rd8, pour Retinal Degeneration type 8, a été retrouvée dans l'ensemble des colonies commerciales de souris C57BL/6N. La dégénérescence rétinienne induite par cette mutation est plus ou moins pénétrante selon la provenance et les conditions d'élevage des souris. Cette variabilité complique bien évidemment la caractérisation de l'impact sur la rétine des autres mutations introduites sur ce fond génétique. De plus, les conséquences de la présence de la mutation rd8 sur l'exécution de tâches comportementales ayant une forte composante visuelle, n'ont jamais été explorées. La question se pose également de savoir quels facteurs environnementaux sont à l'origine de la variabilité des atteintes rétinienne observées chez les souris.

Nous nous proposons de tester si les lésions rétinienne sont totalement absentes chez des souris hétérozygotes pour rd8 (c'est-à-dire ne portant plus cette mutation qu'en une seule copie au lieu de deux), et ce dans deux conditions d'éclairage différentes : les souris seront placées dès leur naissance soit en haut, soit en bas des portoirs, ce qui représente les deux « extrêmes » rencontrés

en animalerie. La structure de leur rétine sera observée par imagerie OCT (non invasive, sans contact) à intervalles réguliers entre les âges de 1 et 18 mois. Les souris seront également testées entre 3 et 18 mois dans des tâches comportementales « simples » ayant une forte composante visuelle, comme la reconnaissance d'un nouvel objet, la piscine de Morris, ou la capacité à rester en équilibre sur une barre tournante.

Remplacement : Intrinsèquement lié aux souris C57BL/6N, ce projet ne peut être abordé via une autre espèce.

Réduction : Les résultats de cette étude indiqueront si la correction de la mutation rd8 permet, dès l'état hétérozygote, non seulement de prévenir les atteintes rétinienne, mais aussi d'améliorer les performances des souris dans des tâches de mémorisation ou d'équilibre. Ils préciseront l'influence de la position des cages dans les portoirs d'animalerie sur la pénétrance des lésions rd8 et leur éventuel impact sur les tâches de mémorisation ou d'équilibre. Si une telle influence était avérée, la variabilité inter-souris dans ces tests pourrait être réduite en contrôlant les paramètres d'éclairage, ce qui permettrait de réduire l'effectif des cohortes dans les projets futurs impliquant ces lignées.

Quatre groupes étant à étudier (deux génotypes, deux conditions de lumière), 48 souris seront examinées au cours de ce projet. Seules des souris mâles seront considérées, car ce sont les plus atteintes par les lésions rd8, ce qui permettra de limiter l'effectif des groupes pour observer des différences significatives. L'observation de la rétine ne se limitera pas à sa partie centrale, mais inclura le quadrant ventral, le plus atteint par les lésions rd8. Les tests choisis pourront être répétés sur les mêmes souris aux différents âges, ce qui limitera également l'effectif total. 12 souris par groupe devraient ainsi permettre d'observer une différence significative entre génotypes et entre conditions de luminosité. Si ce n'était pas le cas, cela indiquerait que ces deux paramètres n'influencent que de façon marginale les résultats des tests choisis.

Raffinement : Les tests choisis sont non invasifs et peu ou pas stressant pour l'animal. L'imagerie OCT, examen réalisé en routine pour les diagnostics en ophtalmologie, requiert une sédation pour permettre l'acquisition des images, mais est sans contact, avec une lumière infra-rouge de très basse énergie, et permettra éventuellement une quantification des lésions rd8 en 3D, ce qui augmentera la puissance statistique des observations par rapport à un classique fond d'œil couleur. Les tests de reconnaissance d'objets basé sur l'attrait des souris pour la nouveauté) et celui de la barre tournante (exercice d'équilibre) ne sont pas stressant pour l'animal. La piscine de Morris, test d'apprentissage et de mémoire spatiale, n'induit qu'un stress léger à cause de l'aversion des souris pour l'eau, mais le temps de nage est limité, et les souris seront rapidement séchées et réchauffées.

Les résultats de cette étude pourraient conduire à un raffinement et/ou une réduction dans de nombreuses autres études, si nous démontrons que placer les souris C57BL/6N devant passer des tests de comportement ayant une forte composante visuelle dans les zones les moins lumineuses des pièces d'élevage permet d'améliorer leurs performances. Ceci permettrait de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des différences significatives dans ces tests, couramment utilisés dans la recherche de gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles et les maladies neurologiques, ainsi que dans le développement de traitement contre ces maladies.

**8559** De nombreuses pathologies peuvent conduire à une dégénérescence de cellules rétinienne et conduire à une cécité partielle ou totale parmi lesquelles on retrouve le glaucome et les neuropathies optiques qui se caractérisent par une perte des cellules ganglionnaires rétinienne. La prévalence du glaucome est mal définie mais estimée entre 2 et 7 % de la population totale et son incidence augmente avec l'âge. La Neuropathie optique, plus rare (prévalence estimée : 1/50 000) est une pathologie d'origine génétique mitochondriale actuellement sans aucun traitement.

Des essais de thérapie génique sont actuellement en développement mais ne peuvent concerner que la neuropathie optique héréditaire et à condition d'intervenir avant une perte cellulaire trop importante. Le projet présenté vise à évaluer le potentiel thérapeutique d'une approche de thérapie cellulaire par transplantation chez le rongeur de cellules ganglionnaires rétinienne générées *in vitro* à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hIPSCs). Nous chercherons à déterminer i) la capacité de survie et d'intégration dans la rétine hôte. ii) Nous évaluerons la capacité des cellules ganglionnaires rétinienne transplantées à générer de nouveaux axones et à rétablir des connexions avec les structures cibles cérébrales. A cette fin, les expériences de transplantations seront réalisées

dans un modèle de neuropathie induite par lésion chirurgicale du nerf optique (chez le rongeur). Des tests électrophysiologiques et comportementaux seront utilisés pour évaluer le bénéfice de la transplantation sur les fonctions visuelles et la fonctionnalité des cellules transplantées. Des analyses histologiques post-mortem seront également menées afin d'évaluer le taux de survie des cellules transplantées, leur localisation précise, leur degré de différenciation, leur intégration dans le circuit rétinien et leur patron de projection (cibles atteintes) intracérébral.

Au total 70 rats seront nécessaires à cette étude. Nous testerons notre thérapie sur des rats (Sprague-Dawley) et des rats « nude ». Les rats « nude » nous permettront de vérifier l'absence de formation de tératomes suite à notre thérapie cellulaire.

Dans le souci de respecter la règle des 3R, les procédures invasives ne seront réalisées que sur un seul des deux yeux. De plus, dans tous les cas expérimentaux ou ce sera possible, l'œil controlatéral servira de contrôle. Ceci permettra de limiter de manière importante le nombre d'animaux utilisés.

Les explorations fonctionnelles non invasives seront privilégiées tel que le test optomoteur (test comportemental permettant d'évaluer la fonction visuelle). L'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire permettra de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Les animaux sont stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

**8560** La progression d'un cancer est un phénomène complexe dépendant des propriétés des cellules cancéreuses mais également des cellules du microenvironnement tumoral comme les cellules du système immunitaire. Ces différentes cellules interagissent et ce dialogue conditionne leurs potentiels de prolifération. L'enzyme lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3) retrouvée dans les cellules cancéreuses et des cellules immunitaires participe à définir la structure de la membrane cellulaire et donc la fonctionnalité de la cellule.

LPCAT3 présente ainsi des potentialités dans la régulation du cancer par une action sur les cellules tumorales et immunitaires. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de LPCAT3 dans la progression tumorale.

Les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement conditionnent le devenir de la tumeur et imposent par conséquent l'utilisation d'un modèle *in vivo* empêchant le remplacement du modèle souris par des modèles *in vitro*. L'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses murines sous la peau permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées.

Pour répondre au volet raffinement, les souris soumises à la procédure expérimentale de transplantation de cellules cancéreuses seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. De plus, les souris porteuses de tumeurs seront surveillées quotidiennement. Au total, 160 souris seront utilisées.

**8561** Suite à nos précédents travaux, l'effet bénéfique de l'association d'extraits 2 plantes sur le métabolisme énergétique de souris diabétiques et de souris nourries avec des régimes riches en graisse a été mis en évidence, notamment sur les profils lipidiques sériques et hépatiques, sur la glycémie, la sensibilité à l'insuline, et la composition corporelle des animaux. Ces travaux ont donné lieu à un dépôt de brevet.

L'objectif de cette étude est de réaliser des dosages supplémentaires afin de renforcer les propriétés intellectuelles de ce brevet.

L'étude a été réalisée selon la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) :

- L'étude se compose de 11 groupes de 10 souris C57BL/6J mâles âgées de 6 semaines en début de protocole. Les souris vont être nourries avec un régime riche en graisse (HFD) pendant 6 semaines, puis pour une durée supplémentaire de 8 semaines les souris seront nourries avec un régime HFD supplémenté avec des extraits de plantes. Les traitements seront incorporés dans la nourriture des animaux. Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur les modèles similaires, un minimum de

10 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

- Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, mesure de la glycémie à jeun, insulino-résistance) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Ces mesures seront réalisées une fois en début de protocole (S0), une fois avant le début de la phase de traitement (S6), en milieu de traitement (S10) et une fois en fin de protocole (S14). Ces mesures étant espacées de plusieurs semaines, ce qui diminue le stress des animaux. De plus un gavage aux glucides sera réalisé une seule fois en fin de protocole (S14) pour la sensibilité à l'insuline.

- Le modèle de souris (C57BL/6J) nourri avec un régime riche en graisse (HFD) est particulièrement bien adapté à l'étude des dyslipidémies en présence d'insulino-résistance et d'obésité des animaux. Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme de dyslipidémie, obésité et insulino-résistance sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 110 souris mâles C57BL/6J seront utilisées pour cette étude.

**8562** La résistance à l'insuline est un trait caractéristique du diabète de type 2 (DT2) et joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Dans des situations d'obésité, le gras s'accumule dans les muscles, le foie et les cellules bêta pancréatiques (cellules produisant l'insuline) où il est transformé en dérivés lipidiques spécifiques. Le but de ce projet est de mettre en évidence la fonction de certains de ces dérivés lipidiques dans l'apparition du diabète de type 2. En changeant artificiellement et spécifiquement au niveau du foie la voie de biosynthèse de certains lipides, nous espérons mettre en évidence s'ils ont une action protectrice ou aggravante sur la sensibilité à l'insuline des cellules. Le foie étant un organe important dans la sécrétion des lipides dans des conditions lipotoxiques, travailler sur l'animal entier nous permettra d'évaluer les conséquences de perturbations métaboliques observées au niveau du foie et dans les tissus périphériques sur l'animal entier.

Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle métabolique intégré. Ce modèle est le seul disponible actuellement et permet de reproduire facilement des situations physiopathologiques normalement observées chez l'homme.

Ce projet prévoit d'utiliser 1200 souris sur 5 ans. Cet effectif est nécessaire pour obtenir des résultats homogènes lors des tests métaboliques pratiqués dans ce projet. Il est à noter que nous réutilisons les mêmes souris pour plusieurs procédures, réduisant ainsi le nombre total d'animaux sacrifiés.

Le bien-être des animaux est au cœur de nos préoccupations. Ainsi, des protocoles d'enrichissement de l'environnement de l'animal seront mis en place avec notamment la présence de nids végétaux. Notre projet comportant l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés, une attention très particulière sera portée à ces animaux afin de déceler tout comportement anormal. Enfin, le sacrifice des animaux sera réalisé sur des animaux préalablement anesthésiés.

**8563** Les actions comportementales que nous réalisons dans notre vie quotidienne sont la résultante d'une suite de commandes et d'opérations effectués dans notre système nerveux et qui sont adaptées à notre environnement. Par exemple, saisir une tasse de café et la porter à ses lèvres requiert un haut degré de précision de l'analyse de l'environnement, du contrôle musculaire et de la perception sensorielle. Ces fonctions sont notamment assurées par le néocortex, l'hippocampe et le cervelet. Leurs neurones sont organisés en circuits appelés microcircuits qui interagissent entre eux via des échanges électrochimiques : appelés activités neuronales. Elles se traduisent par des changements de potentiel électrique membranaire ainsi que de la transmission d'un message via le relargage de neurotransmetteurs à la synapse. La transmission synaptique est classifiée dans deux grandes familles : la transmission excitatrice, dont le neurotransmetteur le plus important est le glutamate, qui rend plus excitable le neurone, et la transmission inhibitrice, dont les transmetteurs principaux sont le GABA et la glycine. La plupart des neurones du système nerveux central reçoit un « barrage »,

variable dans le temps, d'excitation et inhibition dont la balance détermine le profil temporel de la transmission de l'information.

Quelles sont les règles qui déterminent comment inhibition et excitation interagissent au niveau de neurones individuels afin de produire un comportement adapté ? C'est une des questions-clé des neurosciences modernes qui reste non élucidé concernant les mouvements complexes, notamment ajusté par le cervelet. Nous devons obtenir des informations à plusieurs niveaux : de l'organisation morphologique des structures synaptiques, jusqu'à l'enregistrement de l'activité neuronale à la suite d'un barrage physiologique d'excitation et inhibition. Un ensemble de techniques différentes sera donc utilisé pour disséquer le rapport entre excitation et inhibition : immunohistochimie, imagerie de l'activité et optogénétique *in vivo*, électromyographie et comportement *in-vivo*.

L'optogénétique consiste dans l'expression de protéines sensibles à la lumière, dont la stimulation peut amener soit à l'excitation, soit à l'inhibition de populations neuronales spécifiques. L'imagerie cellulaire permet de visualiser les variations en amplitude au cours du temps de la fluorescence provenant de sondes rapportrices de l'activité neuronale et exprimées dans les populations d'intérêts. Les stratégies utilisées pour obtenir l'expression spécifique de ces outils sont génétiques, et se basent sur l'existence et la disponibilité de modèles transgéniques. Les souris constituent le seul mammifère aisément modifiable génétiquement.

L'utilisation de souris en expérimentation *in vivo* ne peut pas être remplacé par des systèmes *in silico* ou *in vitro* pour l'étude des mouvements et coordination motrice. La réduction sera possible particulièrement en ce qui concerne les manipulations morphologiques, où un seul animal fournit typiquement un nombre très élevé d'échantillons utilisables pour des buts différents, et en ce qui concerne les manipulations chronique d'optogénétiques ou d'imagerie cellulaire *in-vivo*, où chaque animal peut être soumis à plusieurs tests en parallèle.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale. Tout effort sera pris pour réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

Ce projet nécessitera 2200 souris.

**8564** Projet : Près de 90 % des décès des patients atteints de cancer sont dus aux métastases. La formation d'une métastase à distance de la tumeur primitive, nécessite que les cellules tumorales franchissent de nombreuses étapes. La première de ces étapes, appelée invasion tumorale, consiste en la dégradation du support, appelé matrice, sur lequel reposent les cellules tumorales. Les mécanismes impliqués dans l'invasion tumorale sont très mal connus, et donc une meilleure compréhension de ces derniers devrait faire considérablement progresser la thérapie anti-métastatique. Quand la matrice est intacte, la tumeur est appelée « cancer *in situ* » ; quand elle est dégradée par les cellules tumorales, la tumeur est appelée « cancer invasif ».

Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer chez la femme. Pour les femmes nées en 1950, le risque cumulé de développer un cancer du sein avant 75 ans est estimé à 12%. Donc, la nécessité de trouver des stratégies thérapeutiques contre le cancer du sein est un enjeu majeur de santé publique. En particulier, dans le cancer du sein, il existe une grande ressemblance génétique entre les tumeurs *in situ* et invasives, et donc, à ce jour, aucun marqueur biologique fiable témoignant de la progression d'une tumeur *in situ* en tumeur invasive n'a pu être identifié.

Certains gènes dits « suppresseurs de métastase », comme NM23-H1 que nous étudions depuis de nombreuses années sont capables d'inhiber la dissémination métastatique. De multiples études cliniques ont rapporté une association inverse entre le taux de NM23-H1, la présence de métastases et un mauvais pronostic dans les cancers du sein. De plus, plusieurs travaux dont les nôtres ont suggéré que la perte de NM23-H1, et non de son homologue NM23-H2, serait cruciale lors de l'invasion tumorale. Nous avons observé en particulier une perte de NM23-H1 dans la partie invasive de tumeur humaine du foie et du colon.

Notre projet a pour but de généraliser et de valider cette hypothèse, et de comprendre le rôle sélectif de NM23-H1 comparé à NM23-H2, au cours de l'invasion tumorale mammaire. Pour cela, nous disposons de matériel biologique unique c'est-à-dire une grande cohorte de cancers du sein humains comportant la partie *in situ* et invasive pour chaque tumeur et un modèle murin particulièrement mis au point pour l'étude du processus invasif. L'expression spécifique de chaque protéine NM23-H1 et

NM23-H2 sera déterminée dans les compartiments *in situ* et invasif de chaque tumeur. La contribution précise de chaque protéine NM23 au cours de l'invasion locale sera analysée en injectant des cellules tumorales humaines de sein exprimant différents taux de NM23 dans la glande mammaire de souris. Enfin, la contribution de NM23-H1/-H2 au processus invasif dépendant de MT1-MMP sera évaluée. En conclusion, ce projet devrait apporter de nouvelles connaissances dans le processus d'invasion tumorale et dans l'identification de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques utiles pour lutter contre la dissémination métastatique.

Type d'animaux : Souris (*Mus musculus*) modèle d'injection intraductale chez la souris immunodéprimée femelle SCID

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 120 souris expérimentales pour une durée maximale de 2 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

**8565** Le but du projet est de déterminer l'impact de l'inactivation d'un gène sur la mise en place des mécanismes de contrôles du stockage lipidique, dans le cadre d'un régime enrichi.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés.

REPLACEMENT : Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme. Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Une cohorte de 20 animaux sera utilisée afin de pouvoir obtenir des résultats valides.

Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités de régulation du métabolisme, à différents âges.

REDUCTION : Tous les tests utilisés font partie des tests classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette série de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

Du fait de l'utilisation de tests standardisés successivement appliqués sur les mêmes animaux expérimentaux, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés.

Nous avons par ailleurs effectué des analyses statistiques permettant de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaire dans chaque test, tout en permettant d'obtenir des résultats fiables.

Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction. Ainsi 20 souris seront utilisées.

RAFFINEMENT :

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Les souris utilisées sont issues d'une lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype létal ou majeur n'a été observé.

**8566** L'hémophilie est une maladie monogénique liée à l'X dont l'origine est un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B) de coagulation. L'hémophilie se traduit par un déficit de la coagulation sanguine en réponse à une hémorragie. Les hémophiles de type A ou B non traités présentent des symptômes tels que des saignements excessifs lors de blessure et parfois même des hémorragies spontanées pouvant être fatales si non traitées.

L'activité biologique des facteurs VIII ou IX s'évalue en pourcentage de la normale. L'individu normal étant considéré comme ayant 100% d'activité. Si l'activité est indétectable (<1%), il s'agit d'une hémophilie sévère, si l'activité est comprise entre 1 et 5%, l'hémophilie est dite modérée; au-delà et jusqu'à 30% l'hémophilie est mineure. L'intervention au niveau de l'activité biologique de ces facteurs peut avoir un bénéfice substantiel pour les patients avec hémophilie sévère.

Le traitement que nous souhaitons développer pour l'hémophilie A et pour l'hémophilie B est basé sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux qui, suite à une injection systémique, sont capables de cibler les hépatocytes et permettre la sécrétion de facteur VIII ou de facteur IX dans le flux sanguin (selon le transgène utilisé hFVIII ou hFIX) à des niveaux thérapeutiques.

Le but de cette étude est d'évaluer chez le macaque *Nemestrina* la toxicité aiguë, l'efficacité de transduction, l'expression et la biodistribution des facteurs VIII ou IX humains suite à l'administration de différentes doses de vecteurs lentiviraux pseudotypés VSVG exprimant 2 transgènes possibles : facteur IX humain (hFIX) ou facteur VIII humain (hFVIII).

Le design expérimental inclut 12 macaques *Nemestrina* (5 à 6 kg) suivis 90 jours suite à l'administration expérimentale des vecteurs.

Les animaux recevront une administration par voie intraveineuse lente (Débit : 10 mL/kg/h maximum) des vecteurs, selon les groupes suivants :

Groupe 1 : 3 animaux qui recevront, après traitement anti inflammatoire, une administration d'une solution de vecteurs lentivirus codant pour le facteur VIII humain (LV - hFVIII-XTEN) à la dose de  $1,5e9$  TU/kg.

Groupe 2 : 3 animaux qui recevront le même traitement que le groupe 1 (LV - hFVIII-XTEN) à une dose inférieure ou supérieure selon les résultats obtenus pour le groupe 1, soit une dose comprise entre  $7,5e8$  et  $3e9$  TU/kg.

Groupe 3 : 3 animaux qui recevront, après traitement anti inflammatoire, une administration d'une solution de vecteurs lentivirus (version différente du groupe 1) codant pour le facteur VIII humain (LV - hFVIII) (dose définie en fonction des résultats obtenus pour le groupe 1 et comprise entre  $7,5e8$  et  $3e9$  TU/kg) ou pour le facteur IX humain (LV - hFIX).

Groupe 4 : 3 animaux qui recevront, après traitement anti inflammatoire, une administration d'une solution de vecteurs lentivirus codant pour le facteur IX humain (LV - hFIX) à une dose comprise entre  $7,5e8$  et  $1,5e9$  TU/kg. L'un de ces animaux servira également de contrôle pour l'évaluation de la toxicité aiguë en ne recevant que le véhicule de la solution d'injection expérimentale (monitoring entre J0 et J28).

Bien qu'il s'agisse d'une étude pilote, 3 animaux par groupe semble être un nombre minimum requis pour détecter une toxicité aiguë éventuelle (suivi des paramètres sanguins : hématologie, biochimie et hémostasie ; analyses immunologiques : cytokines inflammatoires...). L'expression des facteurs VIII ou IX sera monitorées chez tous les animaux. Une étude préliminaire, menée chez les macaques *Nemestrina* et *Fascicularis* avec un vecteur lentivirus pseudotypé VSVG exprimant le transgène hFIX, a montré que, bien qu'une étude statistique soit difficile à mener avec trois animaux par groupe, ce schéma permettait une mesure de l'efficacité et de l'éventuelle toxicité des vecteurs utilisés chez les animaux. Le fait d'utiliser 3 animaux par groupe devrait permettre de répondre aux deux questions principales de cette étude : le facteur VIII est-il exprimé et sécrété ? Peut-on réduire la dose de lentivirus et être en mesure de détecter les protéines thérapeutiques (FVIII et FIX) dans le sang sans toxicité associée ?

L'administration expérimentale se déroulera sous anesthésie générale (fixe avec relai gazeux). Pour limiter toute réaction d'hypersensibilité, un traitement anti inflammatoire (corticoïde + antihistaminique) sera administré par voie intraveineuse avant l'administration expérimentale. En effet, des études précédentes menées chez le chien et le macaque Nemestrina ont montré qu'une injection de lentivirus pseudotypés avec VSV-G (glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse) induit une inflammation transitoire qui peut être contrôlée de cette façon.

Cet acte étant très peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée. Par contre, étant donné la longueur de l'anesthésie, une attention toute particulière sera apportée à la surveillance de la température corporelle (système de réchauffement à air pulsé). La glycémie des animaux sera également étroitement suivie au cours des anesthésies et des apports en glucose (Glucose 30% en intraveineuse) éventuellement mis en place.

Les prélèvements sanguins, programmés tout au long de l'étude, seront, quant à eux, réalisés sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (10 minutes).

Les macaques seront en outre hébergés par groupes de 2 ou 3 dès que possible (hors période de suivi post opératoire par exemple) afin de favoriser les échanges sociaux et leur bien être.

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire. Le centre d'hébergement dispose d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités (suivies via un cahier d'enrichissement) :

- distribution de fruits cachés dans la litière ou en hauteur
- visionnage de films ou documentaires animaliers
- mise à disposition de jouets type Lego ND ou autre
- aménagement de l'habitat (cage de 3 m<sup>3</sup> pour un à deux primates voire hébergement en volières selon possibilités) à l'aide de miroirs et de chaînes traversantes pour favoriser les déplacements verticaux.

**8567** Les glioblastomes multiformes de grade IV (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes très invasives, particulièrement résistantes aux thérapies actuelles. La médiane de survie des patients reste très faible (de l'ordre de 15 à 18 mois). Les traitements actuels (exérèse chirurgicale associée à la radiothérapie et une chimiothérapie adjuvante utilisant le témozolomide (TMZ)) donnent des résultats cliniques faibles. Il est urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse aux traitements pour améliorer le devenir de ces patients. La découverte d'une méthode non invasive permettant de suivre l'évolution d'un glioblastome est une priorité pour les équipes cliniques de neuro-oncologie.

Il y a quelques années il a été montré que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permettait d'obtenir des profils de dénaturation thermique du plasma spécifiques de nombreuses maladies. Nous avons montré récemment par DSC que nous étions capables d'obtenir une telle signature dans le plasma de patients atteints de glioblastomes à des stades avancés (récidive). De façon à vérifier que nous sommes capables de détecter la présence d'un glioblastome à un stade précoce et de suivre son évolution au cours du temps nous voulons mettre au point les conditions d'étude sur un modèle animal (non dépourvu de système immunitaire) de glioblastome *in vivo* (modèle syngénique). En effet il est important de prendre en compte l'impact du système immunitaire sur les signatures obtenues, puisque plusieurs Immunoglobulines font partie des protéines les plus abondantes dans le plasma et sont responsables de la signature de plasmas sains.

A cette fin nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de glioblastome GL261 dans un modèle de souris C57BL/6. Des échantillons de plasma seront collectés avant et après la greffe et le profil calorimétrique de chaque échantillon sera obtenu par DSC de façon à déterminer l'évolution du profil et le corrélérer à l'évolution de la tumeur.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe sera basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 à 6 individus par cage (365x205x140 cm, 530 cm<sup>2</sup>) afin d'éviter le stress de l'isolement. Outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en peri- et post-opératoire si nécessaire. Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant le poids des animaux tous



les deux jours et en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie). Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront sacrifiés sans délai. En parallèle, toujours dans le souci du respect de la règle des 3R (réduction), nous suivrons l'évolution tumorale par imagerie IRM, *in vivo* une technique non invasive permettant le suivi longitudinal des animaux (chaque animal étant son propre contrôle, le nombre d'animaux utilisés est réduit) de façon à suivre « en temps réel » l'évolution tumorale et la corrélérer au profil calorimétrique plasmatique sur un groupe de souris. Enfin si les résultats sont concluants le même suivi sera effectué sur un groupe de souris greffées sous traitement au Témzolomide (thérapie de référence du glioblastome) pour corrélérer le profil DSC à la réponse au traitement.

Au total, un maximum de 240 souris est prévu pour la globalité de l'étude. Le projet s'inscrit dans la recherche de nouvelles approches diagnostiques précoces non invasives.

**8568** En 2012, les cancers du côlon et du poumon font partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate et du sein. Ils représentent les cancers causant le plus de décès. Actuellement le traitement des cancers colorectaux repose sur l'utilisation du 5-Fluorouracile administré en association avec d'autres chimiothérapies telles que l'Oxaliplatine (FOX). Le traitement des cancers du poumon repose principalement sur l'utilisation des dérivés du platine (comme le Cis-Platine) et du pemetrexed (CisPP) (sources ARC et INCa). Bien que ces chimiothérapies aient un effet antitumoral avéré, elles ne conduisent pas systématiquement à une rémission totale du patient, en particulier dans les cas de cancers avancés. Il a été montré récemment que le système immunitaire jouait un grand rôle dans la réponse aux traitements par chimiothérapie. En effet l'activation de certaines cellules immunitaires pourra favoriser la réponse des patients au traitement, alors que leur blocage conduira à son inefficacité. Il serait donc intéressant de trouver des molécules capables de garder les cellules immunitaires toujours actives, afin d'améliorer l'action anticancéreuse des chimiothérapies actuelles.

Le but du projet est d'évaluer l'efficacité antitumorale de l'association de quatre composés (soit la molécule A, la molécule B, la molécule C, ou la molécule D fournies par une société extérieure) avec les chimiothérapies utilisées en clinique dans deux modèles de cancers chez la souris, un pour le côlon et un pour le poumon.

Ce projet se déroulera en trois étapes.

Premièrement, nous évaluerons l'efficacité des traitements sur la croissance tumorale chez les souris type sauvage. Ceci permettra d'évaluer l'efficacité des composés testés par rapport à une chimiothérapie standard seule. Etant donné que certaines cellules du système immunitaire peuvent contribuer à l'élimination des cancers, nous étudierons leur état d'activation chez les souris non traitées et traitées.

Deuxièmement, la nécessité du système immunitaire sera évaluée en réalisant les mêmes expériences chez la souris de type Balb/nude (dépourvue de lymphocytes T et ayant un système immunitaire affaibli).

Troisièmement, si des effets des composés seuls ou en association avec la chimiothérapie sur l'état d'activation des cellules du système immunitaire sont observés dans ces expériences et que les traitements n'ont pas ou peu d'effets sur le modèle Balb/nude, l'utilisation de l'immunothérapie sera envisagée. Pour cela nous sélectionnerons la combinaison de traitements la plus efficace et nous l'associerons à des anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 (2 modulateurs des cellules immunitaires déjà testés en clinique). L'efficacité de cette combinaison sera évaluée de la même manière que précédemment décrit, à savoir la croissance tumorale et l'état d'activation des cellules immunitaires. Le nombre total maximum de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 2320. Si aucun effet bénéfique de certains composés seuls ou en association avec la chimiothérapie sur la réponse anti-tumorale (croissance et infiltrats immunitaires) n'est observé à la fin de la première étape, alors ces composés ne seront pas utilisés pour les étapes suivantes. Si aucune différence n'est observée entre les effets des traitements chez la souris type sauvage et la souris nude, alors l'étude sera arrêtée à la fin de l'étape 2. Ainsi le nombre de 2320 souris annoncé est une estimation maximale et le nombre de souris réellement utilisées pourrait être moins important que prévu.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et réalisées dans un seul modèle pour chacun des deux types de cancers étudiés ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Dans la même optique, si les premières expériences ne montrent pas d'effet d'un ou de plusieurs produits, celui-ci ou ceux-ci ne seront plus utilisés dans les expériences suivantes. L'étude de l'effet des produits A, B, C et D sur des cellules immunitaires *in vitro* permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux est réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

**8569** Ce projet vise à l'évaluation pré-clinique d'un nouveau médicament pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Les leucémies aiguës représentent environ 1% des cancers, soit 3 500 nouveaux diagnostics en 2010 en France (INCa). Les traitements actuels reposent sur la chimiothérapie en association avec l'allogreffe de moelle mais le pronostic global reste médiocre (survie à 5 ans : 5 à 40%) en raison de la fréquence élevée des rechutes. Ces rechutes sont causées par la persistance des cellules souches leucémiques (CSL) insensibles aux thérapeutiques actuelles. Le développement de thérapies permettant de cibler ces CSL est donc un enjeu majeur dans cette pathologie. Ce projet scientifique consiste à évaluer l'efficacité *in vivo* d'une thérapie ciblant spécifiquement ces CSL. Ces médicaments ont déjà été testés *in vitro* sur des lignées cellulaires de LAM et sur des cellules primaires de patients et ont montré une très bonne efficacité en induisant la mort cellulaire à la fois des cellules de lignées et des cellules primaires issues de patients. Les modèles *in vitro* ne peuvent pas remplacer le modèle *in vivo* car ils ne reproduisent pas la maladie humaine (maladie systémique) et la durée de survie des cellules primaires *ex vivo* est très limitée dans le temps. Il n'est donc pas possible de mettre en place des méthodes de substitutions qui évitent l'emploi d'animaux vivants. Les souris utilisées dans ce projet représentent le modèle le plus propice aux transplantations de cellules leucémiques humaines car la greffe ne nécessite pas d'irradiation préalable de l'animal et elle représente le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine. La durée de ce projet est de 3 ans, il utilisera au total 170 souris. Ce nombre a été calculé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats de l'expérience et d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Les souris recevront une greffe de cellules tumorales issues de la moelle osseuse de patients leucémiques par injection intraveineuse avant d'être traitées par une molécule candidate antileucémique administrée dans leur nourriture. Les différentes procédures envisagées ne nécessitent qu'une simple contention de l'animal car elles sont peu douloureuses, elles ne nécessitent donc pas d'anesthésie locale ou systémique. Des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à la disposition des souris : coton, litière papier pour la confection de nids. La surveillance des animaux sera quotidienne avec une attention particulière apportée au niveau des points d'injection et de ponction (prélèvements sanguins pour le suivi de la numération sanguine de l'animal), à l'aspect de l'animal en recherchant les signes cliniques évocateurs d'anémie (pâleur des yeux ou décoloration des extrémités) et au poids de l'animal. Les points limites spécifiques à ce projet seront : le taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL ou l'hématocrite inférieur à 38% ou une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial.

Il s'agit d'un modèle pré-clinique qui permettra de faire la preuve de l'efficacité de ces médicaments anti-leucémiques *in vivo*, ce qui conduira ensuite à la mise en place d'un essai clinique chez l'homme.

**8570** Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur primitive du foie la plus fréquente. Elle représente la 5ème cause de mortalité par cancer dans le monde avec une incidence estimée à plus de 500 000 nouveaux cas par an. Le pronostic vital est extrêmement faible faute de traitements curatifs efficaces, la médiane de survie ne dépassant pas 8 mois post-diagnostic. Le CHC se développe fréquemment sur un foie cirrhotique ou suite à une inflammation chronique. Les facteurs de risques sont bien identifiés mais les mécanismes moléculaires conduisant à la transformation tumorale de l'hépatocyte demeurent encore mal compris. Afin d'empêcher l'émergence de tumeurs, le système immunitaire assure en permanence une immuno-surveillance dynamique. Toutefois, dans certains contextes, les acteurs du système immunitaire peuvent paradoxalement favoriser la croissance tumorale. A partir de ces observations, l'échappement à l'immuno-surveillance a été proposé comme 7ème

caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses. Très récemment, les cellules lymphoïdes innées (CLI) partageant des caractéristiques avec des populations de cellules anti-tumorales Natural Killer ont été identifiées comme de nouveaux acteurs immuns. Peu de travaux ont fait état de leur rôle dans le contexte de pathologies tumorales. Aussi, ce projet vise à comprendre le rôle de ces CLI dans un contexte pathologique comme le carcinome hépatocellulaire (CHC).

Nous étudierons le rôle fonctionnel des CLI à partir de modèles murins pertinents récapitulant la carcinogenèse hépatique humaine. Le recours à un modèle animal est indispensable compte tenu de la complexité des mécanismes l'origine de la formation de cancers hépatiques, qui ne peuvent être reproduits *in vitro*. Par ailleurs, comme nous nous intéressons aux populations immunitaires présentes dans le microenvironnement des tumeurs hépatiques, nous avons recours au un transfert adoptif de cellules immunitaires.

Ce projet utilisera 400 souris sur 5 ans dans une procédure de gravité légère et une procédure de gravité modérée. Le développement de CHC est soit inné, soit induit par activation de la voie wnt b-caténine dans les hépatocytes suite à une injection de tamoxifène. L'état de santé des animaux sera surveillé à l'aide de différents critères. Les animaux seront sacrifiés en fin d'étude. Le nombre d'animaux nécessaire repose sur notre expérience de la conception de ce type d'étude et sera réduit au minimum. Le bénéfice attendu de ce projet est de posséder une meilleure compréhension des rôles des CLI lors de la phase d'initiation et de développement du CHC. Pour les injections toutes réalisées par voie intraveineuse sont réalisées après anesthésie des animaux en utilisant l'isoflurane. Lors de ces expériences, l'état des souris sera surveillé par une pesée, l'observation de l'agilité des animaux dans la cage, l'état du pelage, la prostration des animaux. Le cumul de deux de ces critères conduit au sacrifice des animaux.

La combinaison des approches développées dans ce projet devrait permettre de définir leurs modes d'action pour pouvoir manipuler ces cellules *in vivo* afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques d'immuno-interventions en cancérologie digestive. L'ensemble de ces expériences offre de nouvelles perspectives thérapeutiques d'immuno-intervention pour le traitement des CHC humains.

**8571** La phagothérapie (usage de bactériophages) apparaît aujourd'hui comme une alternative thérapeutique pertinente dans le traitement des infections bactériennes. En effet, de nombreux antibiotiques sont devenus inefficaces du fait de l'émergence de la multirésistance des bactéries et nombre d'infections, telles que les infections ostéoarticulaires ou du pied diabétique, placent les médecins et les patients dans des situations d'impasse thérapeutique. Les bactériophages sont des virus qui possèdent la particularité de n'infecter que les bactéries, d'être inoffensifs pour tous les organismes eucaryotes tels que les mammifères (humains, animaux) et d'être très spécifiques de l'espèce bactérienne qu'ils attaquent. Ils sont déjà largement utilisés chez l'homme sous forme de cocktails en Europe de l'Est mais, s'agissant d'organismes vivants, leur développement en France se heurte à un cadre réglementaire peu clair et inadapté à la phagothérapie dans la conduite d'essais cliniques. De ce fait, les agences règlementaires demandent, entre autres, de vérifier le devenir et la distribution des phages dans l'organisme après une injection systémique ou locale.

Dans ce projet, il est donc prévu d'étudier la pharmacocinétique d'une association de trois bactériophages anti- Staphylocoque doré, actuellement en développement, après 3 modes d'injections : systémique, locale au niveau de la voûte plantaire et enfin locale en intra-articulaire au niveau de la rotule. Ces voies d'administration sont les voies prédestinées au traitement par bactériophages dans le cadre des infections ostéoarticulaires (sur prothèse ou pied diabétique). Du sang ainsi que différents organes (foie, reins et rate) seront prélevés à différents temps afin d'évaluer la biodistribution de ces phages dans l'organisme.

Pour la mise en œuvre de ce projet, 96 souris Balb/c femelles seront utilisées.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, le nombre d'animaux par point sera de 5 au lieu de 8, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux de l'étude. En effet, les techniques de détermination de la concentration en bactériophages préalablement mises au point *in vitro* au laboratoire sont maintenant très reproductibles. En revanche, une étude de pharmacocinétique ne pouvant s'affranchir de l'utilisation d'organismes vivants, aucune alternative de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, la totalité des procédures d'injection impliquant les

animaux (injection IV, voute plantaire ou articulation du genou) est réalisée sous anesthésie générale afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance quotidienne sera également réalisée pour cette étude.

**8572** Les glioblastomes multiformes de grade IV (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes très invasives, particulièrement résistantes aux thérapies actuelles. La médiane de survie des patients reste très faible (de l'ordre de 15 à 18 mois). Les traitements actuels (exérèse chirurgicale associée à la radiothérapie et une chimiothérapie adjuvante utilisant le témozolomide (TMZ)) donnent des résultats cliniques faibles. Il est urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse aux traitements pour améliorer le devenir de ces patients. La découverte d'une méthode non invasive permettant de suivre l'évolution d'un glioblastome est une priorité pour les équipes cliniques de neuro-oncologie.

Il y a quelques années il a été montré que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permettait d'obtenir des profils de dénaturation thermique du plasma spécifiques de nombreuses maladies. Nous avons montré récemment par DSC que nous étions capables d'obtenir une telle signature dans le plasma de patients atteints de glioblastomes à des stades avancés (récidive). De façon à vérifier que nous sommes capables de détecter la présence d'un glioblastome à un stade précoce et de suivre son évolution au cours du temps nous voulons mettre au point les conditions d'étude sur un modèle animal (non dépourvu de système immunitaire) de glioblastome in vivo (modèle syngénique). En effet il est important de prendre en compte l'impact du système immunitaire sur les signatures obtenues, puisque plusieurs Immunoglobulines font partie des protéines les plus abondantes dans le plasma et sont responsables de la signature de plasmas sains.

A cette fin nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de glioblastome GL261 dans un modèle de souris C57BL/6. Des échantillons de plasma seront collectés avant et après la greffe et le profil calorimétrique de chaque échantillon sera obtenu par DSC de façon à déterminer l'évolution du profil et le corrélér à l'évolution de la tumeur.

Dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe sera basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 à 6 individus par cage (365x205x140 cm, 530 cm<sup>2</sup>) afin d'éviter le stress de l'isolement.

Outre l'anesthésie durant la chirurgie, nous prévoyons d'administrer de l'analgésie en péri- et post-opératoire si nécessaire. Après la greffe nous suivrons la progression de la pathologie en mesurant le poids des animaux tous les deux jours et en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie). Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissaient, les animaux seront euthanasiés sans délai. En parallèle, toujours dans le souci du respect de la règle des 3R (réduction), nous suivrons l'évolution tumorale par imagerie IRM, in vivo une technique non invasive permettant le suivi longitudinal des animaux (chaque animal étant son propre contrôle, le nombre d'animaux utilisés est réduit) de façon à suivre « en temps réel » l'évolution tumorale et la corrélér au profil calorimétrique plasmatique sur un groupe de souris. Enfin si les résultats sont concluants le même suivi sera effectué sur un groupe de souris greffées sous traitement au Témzolomide (thérapie de référence du glioblastome) pour corrélér le profil DSC à la réponse au traitement.

Au total, un maximum de 240 souris est prévu pour la globalité de l'étude. Le projet s'inscrit dans la recherche de nouvelles approches diagnostiques précoces non invasives

**8573** Notre domaine de recherche est celui de la réaction inflammatoire et de sa résolution. Dans ce contexte nous nous intéressons aux cellules immunitaires notamment aux neutrophiles et aux macrophages. Les neutrophiles ont une fonction essentielle de défense de notre organisme contre les pathogènes et ensuite, ils doivent être éliminés du site inflammatoire pour éviter qu'ils ne déversent leur contenu proinflammatoire et toxique au contact des tissus environnants. Aussi,

l'élimination de ces cellules par les macrophages constitue une étape critique de la résolution de l'inflammation.

Dans diverses pathologies inflammatoires et/ou autoimmunes, les neutrophiles peuvent jouer un rôle néfaste du fait de leur non élimination du site inflammatoire. L'objectif de nos travaux est donc de contribuer à élucider les mécanismes de l'inflammation responsables de la persistance des neutrophiles dans des pathologies inflammatoires chroniques.

Afin de valider *in vivo* certaines des cibles thérapeutiques préalablement identifiées dans des études *in vitro*, nous utiliserons plusieurs procédures expérimentales et différentes lignées de souris génétiquement modifiées. Dans une première approche, nous traiterons les souris afin d'induire une inflammation locale. Après quelques heures, les souris seront euthanasiées, les organes et/ou cellules seront prélevés post-mortem et les mécanismes inflammatoires seront analysés *ex vivo*. Alternativement, un traitement ciblant une des cibles thérapeutiques potentielles sera administré aux animaux pour analyser le mécanisme de résolution de l'inflammation. Enfin, nous souhaitons créer un modèle de vascularite autoimmune. Chez l'homme, il s'agit d'une pathologie grave (mortelle si elle n'est pas soignée) caractérisée par une inflammation systémique nécrosante des vaisseaux, avec des symptômes cliniques majeurs au niveau pulmonaire et rénal. Pour induire cette maladie, nous effectuerons un transfert de cellules exprimant une protéine spécifique chez l'animal sous anesthésie générale. L'évolution de la pathologie sera suivie régulièrement afin de détecter d'éventuelles lésions vasculaires et de limiter au maximum une éventuelle souffrance ou angoisse chez l'animal. Ce modèle expérimental, s'il réussit, sera un modèle "pionnier" de vascularite autoimmune afin de rechercher un traitement.

Le nombre maximum de souris utilisées sera de 1092.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse prolongée infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance quotidienne et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre certains des mécanismes impliqués dans le développement de pathologies inflammatoires. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement de pathologies inflammatoires chez les patients.

**8574** Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les nouveaux neurones nés à l'âge adulte (Adu) s'intègrent aux réseaux des neurones formés au cours du développement (Dev). Ces neurones semblent posséder des propriétés différentes des neurones développementaux. En effet, des études réalisées sur le rat mâle adulte ont montré qu'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique (LA) entraîne une complexification de l'arborisation dendritique des néo-neurones, mais n'affecte pas les neurones formés au cours du développement.

A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que l'effet spécifique de l'apprentissage spatial sur les neurones formés à l'âge adulte pourrait être lié à l'existence d'une connectivité neuronale différente de celle mise en place au cours du développement.

Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'étudier la connectivité des deux populations de neurones (formés au cours du développement et formés à l'âge adulte) en condition basale et suite à un apprentissage spatial.

Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal, une approche *in vitro*, ou *in silico*, ne peut être envisagée et le projet sera réalisé sur des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=720). Le nombre d'animaux utilisés par groupe est défini d'après les études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre tient compte des aléas des expérimentations et de la nécessité d'avoir une cohorte suffisante pour étudier l'impact de l'apprentissage spatial sur la connectivité des nouveaux neurones. Les approches utilisées seront raffinées notamment par l'utilisation d'anesthésies générale, locale, d'analgésie ainsi que la surveillance quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. En cas de mise en danger

de ce bien-être des procédures ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

**8575** Parmi les différents axes de recherche de nouveaux traitements dans le domaine de l'oncologie, l'immunothérapie représente actuellement un axe majeur de développement, notamment du fait de résultats prometteurs observés sur certains types tumoraux, et cela même en phase clinique.

Notre projet s'inscrit dans ce contexte, mais vise plus particulièrement à valider une nouvelle stratégie ciblant les tumeurs actuellement non détectées par l'organisme.

Dans ce projet, nous prévoyons de tester la combinaison d'une molécule ayant déjà prouvé une efficacité vaccinale avec de nouvelles molécules, afin d'en améliorer l'effet thérapeutique.

**REMPLACEMENT** : Ce type de projet ne peut s'effectuer à l'heure actuelle que sur des modèles animaux, présentant des réponses immunitaires complexes et non étudiables sur cultures cellulaires ou in silico. En particulier, nous travaillerons avec la souris qui est un modèle de référence en oncologie.

**REDUCTION** : Les moyens d'étude choisis l'ont été notamment en privilégiant la réduction du nombre d'animaux étudiés.

Ainsi, dans les deux volets que comporte notre étude, nous utiliserons 5 animaux par groupe expérimental, nous permettant de valider les réponses immunitaires des animaux tout en limitant l'usage des animaux.

Ce premier projet constitue une preuve de concept, et sera focalisé sur la capacité de nos traitements à enclencher une réponse du système immunitaire. Pour cela, nous pratiquerons des injections sous-cutanées chez les animaux et étudierons ensuite les cellules immunitaires présentes dans les animaux.

La première étude visera à montrer l'effet de la combinaison d'un vecteur viral, d'un vaccin et d'un anticorps spécifique à différentes doses. Les multiples combinaisons testées avec ou sans l'un des agents permettront de valider l'amélioration de l'effet sur le système immunitaire.

La seconde expérience cherchera à valider dans le temps le maintien de l'effet immunitaire observé. Dans cette étude, nous étudierons de manière qualitative les réactions immunitaires, notamment en terme de quantités et de qualités des cellules immunitaires générées.

Un total de 220 souris théorique est prévu pour l'ensemble de cette demande, incluant notamment un réplica de chaque protocole.

**RAFFINEMENT** : Nous n'attendons aucune réaction forte des traitements utilisés, mais nous observerons l'état des animaux de manière régulière et des points limites éthiques sont fixés afin d'éviter toute souffrance d'animaux durant le projet.

**8576** Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les nouveaux neurones nés à l'âge adulte (Adu) s'intègrent aux réseaux des neurones formés au cours du développement (Dev). Ces neurones semblent posséder des propriétés différentes des neurones développementaux. En effet, des études réalisées sur le rat mâle adulte ont montré qu'un apprentissage spatial entraîne une complexification de l'arborisation dendritique des néo-neurones, mais n'affecte pas les neurones formés au cours du développement.

A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que l'effet spécifique de l'apprentissage spatial sur les neurones formés à l'âge adulte pourrait être lié à l'existence d'une connectivité neuronale différente de celle mise en place au cours du développement.

Pour tester cette hypothèse, nous proposons d'étudier la connectivité des deux populations de neurones (formés au cours du développement et formés à l'âge adulte) en condition basale et suite à un apprentissage spatial.

Puisque ce projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal, une approche in vitro, ou in silico, ne peut être envisagée et le projet sera réalisé sur des rats mâles de la souche Sprague-Dawley (n=400). Le nombre d'animaux utilisés par groupe est défini d'après

les études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre tient compte des aléas des expérimentations et de la nécessité d'avoir une cohorte suffisante pour étudier l'impact de l'apprentissage spatial sur la connectivité des nouveaux neurones. Les approches utilisées seront raffinées notamment par l'utilisation d'anesthésies générale, locale, d'analgésie ainsi que la surveillance quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien-être. En cas de mise en danger de ce bien-être des procédures ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

**8577** Le chondrosarcome (CHS) est une tumeur osseuse maligne primitive se développant à partir du tissu cartilagineux. Son abondante matrice extracellulaire de nature chondrogénique ainsi que l'absence de vascularisation limitent la diffusion de molécules thérapeutiques jusqu'au tissu tumoral, faisant du CHS une tumeur chimio- et radio-résistante. Le seul traitement efficace à ce jour reste la chirurgie qui possède un taux de survie à 10 ans de seulement 21 % en cas de rechute et dans les formes les plus graves. Pour pallier ce problème, notre unité développe une nouvelle stratégie thérapeutique bi-spécifique visant à exploiter les deux caractéristiques du microenvironnement du CHS, à savoir une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et un tissu hypoxique, afin d'adresser, de façon spécifique, des molécules thérapeutiques jusqu'à leur cible. En effet, il est connu que l'hypoxie tumorale est impliquée dans la résistance des tumeurs aux traitements de chimio- et radio-thérapies conventionnelles. Pour cela, une prodrogue activable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes du CHS par un vecteur ammonium quaternaire a été synthétisée par notre équipe de chimistes et sélectionnée sur la base de son activité in vitro. L'objectif est donc d'utiliser cette prodrogue activable en situation d'hypoxie pour diminuer la fraction hypoxique des tumeurs et potentialiser l'action secondaire des chimio- et radio-thérapies utilisées en co-traitement. Une molécule non vectorisée vers les protéoglycanes mais activable en hypoxie a également été synthétisée afin de valider la stratégie de vectorisation vers les protéoglycanes.

Les objectifs de cette étude seront : 1-Mettre au point un modèle de xénogreffe de cellules de chondrosarcome humain (cellules JJ012) implantées en sous cutané (au niveau d'une des pattes arrière) chez des souris immunodéprimées de type SCID CB17. 2- De suivre les paramètres pharmacocinétiques des prodrogues via des études de biodistribution réalisées sur le modèle de xénogreffe JJ012 mais également sur le modèle H-EMC-SS préalablement mis au point. 3- De déterminer l'efficacité antitumorale des prodrogues associées à la radiothérapie. Pour cela, des études préliminaires viseront à déterminer la dose et le débit de dose avec lesquelles irradier les tumeurs. Au cours de ces études des séquences d'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) seront réalisées afin de déterminer les paramètres de vascularisation et l'efficacité antitumorale sera déterminé par mesure du volume tumoral au pied à coulisse. Un suivi du statut hypoxique sera également réalisé par imagerie fluorescente et imagerie photoacoustique. Les effets indésirables seront également suivis par des pesées régulières des souris, des analyses sanguines (NFS), ainsi qu'un suivi de l'état général des souris. 4- De déterminer l'efficacité antitumorale des prodrogues associées à la chimiothérapie (doxorubicine). Les effets indésirables seront également suivis par des pesées régulières des souris, des analyses sanguines (NFS), ainsi qu'un suivi de l'état général des souris.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé conformément à la règle des 3R et est de 470 souris. En effet, le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. Des méthodes de raffinements sont utilisées avec un souci du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieu, surveillance quotidienne) mais aussi par l'anesthésie des animaux avant toute expérimentation, et administration si besoin d'antalgiques. L'utilisation de nombreuses techniques in vitro en amont a également permis de remplacer l'utilisation de nombreux animaux.

Au finale, ces études précliniques devraient permettre de valider les deux co-traitements pour la prise en charge du chondrosarcome en potentialisant l'action des chimio- et radio-thérapies conventionnelles en diminuant la fraction hypoxique des tumeurs grâce à des prodrogues activables en hypoxie ciblant les protéoglycanes.

**8578** La toxoplasmose et la néosporose sont deux maladies dues aux protozoaires *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum*, respectivement. *Toxoplasma* peut contaminer l'eau, la viande et les légumes destinés à l'alimentation humaine. Bien que bénigne chez les individus immunocompétents dans la majorité des cas, la toxoplasmose peut être grave chez le fœtus en cas de primo-infection maternelle pendant la grossesse, provoquant des séquelles cérébrales et oculaires sévères, et peut également se révéler mortelle chez les patients immunodéficients. Chez les animaux, notamment les ovins et les caprins, *Toxoplasma* est responsable d'avortements. C'est également le cas de *Neospora*, qui, transmis par les déjections de canidés, peut provoquer des avortements chez les bovins. Bien que ces deux parasites soient très proches d'un point de vue phylogénétique, *Toxoplasma*, agent de zoonoses, est un problème de santé publique. Tandis que *Neospora* est un problème d'ordre vétérinaire.

Il existe plusieurs génotypes au sein de l'espèce *T. gondii*, notre étude portera sur le génotype I qui regroupe les souches virulentes qui entraînent une toxoplasmose aiguë et le génotype II qui regroupe les souches chroniques kystogènes qui provoquent une toxoplasmose asymptomatique. Le génotype II est le génotype prédominant en France.

Il existe deux problématiques majeures, et complémentaires, concernant la lutte contre ces deux protozoaires. La première est le manque de molécules thérapeutiques ayant une activité antiparasitaire. La seconde est l'émergence de mécanismes de résistances à ces molécules. Les traitements utilisés sont, pour la plupart, efficaces contre les deux parasites. Ils reposent sur des molécules anciennes non dénuées d'effets secondaires. Dans ce contexte, depuis près de 3 ans, nous cherchons à identifier de nouveaux composés antiparasitaires.

Afin de limiter au maximum le nombre de souris utilisées, les composés sont criblés *in vitro* permettant ainsi de sélectionner les composés présentant une activité anti-parasitaire et n'ayant pas de la toxicité cellulaire *in vitro*. Cette approche *in vitro* nous permet ainsi de sélectionner les composés d'intérêt et ainsi de limiter au maximum le nombre d'animaux à utiliser lors de l'approche *in vivo*. L'identification de composés antiparasitaires dont l'indice thérapeutique (rapport activité antiparasitaire/toxicité) est prometteur, justifie le passage à des tests *in vivo*. Actuellement, 2 composés ont répondu au critère de sélection *in vitro* et seront testés *in vivo*.

Soit un total de 160 souris maximum pour chaque composé, et 60 souris utilisées pour les témoins/contrôles effectués qu'une seule fois pour chaque modèle. Nous envisageons de tester 2 molécules en 5 ans, soit un nombre maximum de 380 souris sur 5 ans. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation après leur arrivée en zone d'hébergement, et un enrichissement des cages notamment avec bandes de papier, aucun hébergement individuel n'est prévu. Les souris une fois inoculées seront observées quotidiennement.

**8579** Les glioblastomes sont les tumeurs primitives du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Les traitements incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont peu efficaces et ces tumeurs demeurent incurables, avec une courbe de survie inférieure à 15 mois.

Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de gliomes (GiCs) sont responsables du développement de la tumeur et des récurrences. Fortement hétérogènes, les glioblastomes se comportent d'une part, de territoires enrichis en cellules souches qui se multiplient activement et sont insensibles aux traitements, et d'autre part de zones différenciées, non proliférantes et sensibles aux chimiothérapies. Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anticancéreuses en induisant la différenciation des GiCs et leur sensibilisation aux chimiothérapies conventionnelles. Pour cela nous identifions des gènes contrôlant les propriétés souches des GiCs dans la perspective de les inhiber ou les stimuler pour bloquer la tumorigenèse. Parmi ces gènes, *CELF2* et les microRNA (miR) dont il est la cible pourraient représenter des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, *Celf2* promeut la prolifération clonale, le potentiel invasif et le maintien de l'identité souche des GiCs alors que les miRs inhibent son expression et stimulent la différenciation. Ces résultats, obtenus *in vitro*, ont été confirmés dans deux modèles tridimensionnels substitutifs, les tissus glio-neuronaux reconstruits et la culture organotypique de coupe de cerveau de souris, qui remplacent puis réduisent le nombre de sujets utiles lors de l'expérimentation animale dont l'objectif sera de démontrer que *CELF2* est un acteur du développement du glioblastome et une cible pour des traitements. Pour cela, deux cultures primaires différentes de GiCs dépourvues de *CELF2*, exprimant



les microRNA ciblant CELF2 et contrôles seront greffées dans le cerveau des souris immunodéprimées (Nude). Dans le but de réduire le nombre d'animaux et raffiner nos expériences, nous utilisons un dispositif d'imagerie qui permet de suivre le développement tumoral avec des GiCs luminescentes, sans affecter la quantité de mesure. Observés quotidiennement, les animaux restent vivants jusqu'au terme de l'expérience (26 semaines) ou jusqu'à l'apparition de signes cliniques critiques évalués dans une grille de score qui garantit la prévention de la souffrance animale par l'administration préventive d'antalgique, d'anti-inflammatoire et définit les points limites. Toujours dans le but de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire et raffiner nos expériences, nous avons fait des hypothèses de travail pour que nos résultats soient statistiquement significatifs. Ainsi, dix animaux par condition expérimentale seront utiles. Au total ce projet utilisera 160 souris réparties en 16 lots de dix individus. Les souris seront hébergées par quatre ou cinq dans les cages de façon à ce que chaque animal est un espace suffisant et comportant des objets à ronger et des igloos pour leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. Les résultats attendus permettront d'établir clairement le rôle de CELF2 dans le processus tumorigénique et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients. De plus, nous obtiendrons des données importantes pour comprendre la biogenèse du glioblastome, encore très peu connue.

**8580** La greffe allogénique est aujourd'hui le principal traitement permettant de palier à un grand nombre de pathologies à un stade terminal. Le caractère allogénique de ces greffes, de cellules ou d'organes, impliquent le suivi de traitements immunosuppresseurs au long cours pour limiter le rejet de greffe. Ces traitements présentent des effets secondaires importants, notamment des risques accrus d'apparition de maladies opportunistes ou de cancers. Le développement de thérapies innovantes visant à induire une tolérance allogénique opérationnelle constitue donc un enjeu majeur pour toutes situations cliniques limitées par l'alloréactivité.

C'est dans cette optique que notre équipe a montré qu'un protocole de thérapie génique consistant à exprimer spécifiquement dans le foie de souris receveuses, une molécule de CMH allogénique de souris donneuses permet d'induire une tolérance immunologique à une greffe allogénique. La preuve de concept a été effectuée dans un modèle de greffe d'îlots pancréatiques allogéniques. Nous avons démontré que cette tolérance immunologique induite dépendait de l'expansion, dans le foie, d'une population de lymphocytes CD8+ régulateurs (LT CD8+ regs). Leur fonction régulatrice a été confirmée *in vivo* par des expériences de transfert adoptif lors de greffes d'îlots pancréatiques allogéniques.

Le projet présenté ici vise à approfondir la caractérisation, chez la souris, de cette population régulatrice prometteuse. Les mécanismes de génération et de maintien de cette population lymphocytaire dans le foie des souris traitées par thérapie génique vont être investigués. Cela se traduit par l'étude des interactions potentielles de ces lymphocytes avec les hépatocytes exprimant la molécule de CMH allogénique mais également avec des populations cellulaires hépatiques que l'on sait impliquées dans les phénomènes de tolérisation telles que les cellules de Kupffer ou les cellules dendritiques. Afin de pouvoir suivre ces lymphocytes dans le foie des souris, il faut les marquer. Pour cela, ils seront isolés à partir de souris GFP ou de souris wt puis marqués extemporanément, puis injectés à des souris naïves ou préalablement rendues tolérantes. Le comportement de ces lymphocytes dans le foie sera ensuite étudié, dans un premier temps *ex vivo* sur coupe épaisse de foie puis *in vivo* chez la souris vivante, grâce à l'imagerie intravitale. Ces études seront rendues possibles par des collaborations avec une plate-forme spécialisée en observation microscopique ainsi qu'avec une équipe spécialisée dans l'optimisation de marquage fluorescent.

Le nombre d'animaux utilisé sera de 1540 souris maximum pour combiner un nombre réduit d'animaux (optimisation des groupes contrôles et des temps d'euthanasie des animaux) avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Les animaux sont anesthésiés profondément et localement et placés sur plaque chauffante durant les procédures expérimentales de façon à minimiser la souffrance.

**8581** Le projet porte sur l'étude de la réponse immunitaire de la Truite arc en ciel dirigée contre une bactérie pathogène majeure de cette espèce, *Aeromonas salmonicida* sub *salmonicida*. Cette bactérie est responsable de la furunculose qui est à l'origine d'une mortalité importante dans les élevages truiticoles et de pertes économiques non négligeables du fait d'une non-valeur commerciale des animaux atteints (présence de furoncles musculaires). Actuellement les moyens de contrôle de cette infection sont limités. Même s'il existe un vaccin, celui ci est peu utilisé par les éleveurs du fait d'une efficacité controversée et de lésions intra-abdominales observées suite à l'injection. L'antibiothérapie est plus utilisée mais l'existence d'isolats multirésistants pourrait compromettre l'efficacité de ces traitements.

Dans le cadre actuel sur la limitation des intrants médicamenteux dans les élevages (plan ecoantibio 2017), notre objectif est d'apporter des connaissances sur la bactérie et la réaction de l'hôte afin de proposer des méthodes alternatives de contrôle.

Nous ne pouvons pas utiliser d'autres animaux que la Truite arc en ciel car c'est l'espèce cible (remplacement).

Pour ce projet, suite à l'application du principe de réduction, 300 truites Arc en ciel de 40 à 50 g seront utilisées. Une première étape consistera à déterminer la dose infectieuse d'*A. salmonicida* nécessaire pour infecter les poissons et entraîner la mort de 50% et de 20 % d'entre eux (DL50 et DL20). Pour cela, 6 doses infectieuses seront testées de 0 (témoin négatif) à 1000000 CFU / truites) sur des lots de 10 poissons. Un duplicat sera effectué pour confirmer et éventuellement affiner les DL50 et DL20. Trois lots de 10 poissons seront constitués ensuite en triplicat (un lot témoin non infecté et 2 lots infectés avec la DL20 ou la DL50) et suivis pendant 15 jours afin d'étudier leur réponse immunitaire. Toutes les manipulations des poissons (pesée, pose d'un transpondeur, prélèvement sanguin, injection de la dose infectieuse) seront réalisés après anesthésie des poissons (raffinement des procédures expérimentales). Les paramètres d'ambiance (température, oxygénation) seront mesurés quotidiennement et dans chaque aquarium pour contrôler les valeurs critiques d'élevage. Tous les individus moribonds seront retirés de l'expérimentation et euthanasiés.

**8582** La maladie de Marek, causée par un virus, est associée à un cancer mortel chez la poule, de type lymphome. Les vaccins utilisés depuis les années 1970 préviennent la formation des tumeurs mais n'empêchent pas la propagation du virus encore très présent dans les élevages à l'échelle mondiale. Cette infection provoque une diminution marquée de l'efficacité de la réponse immunitaire, ou immunosuppression (IS) : bien que transitoire, elle est susceptible d'accroître la vulnérabilité des animaux à d'autres agents infectieux présents dans les élevages et de diminuer l'efficacité de la réponse aux vaccins administrés aux poussins.

Dans une 1ère partie de ce programme, nous avons étudié, nous avons étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'IS et avons proposé une méthode non invasive pour le diagnostic de l'IS basée sur une numération sanguine. Dans cette 2e partie, nous proposons d'évaluer par cette méthode, l'IS induite par des vaccins commerciaux et par des vaccins candidats développés par un de nos collaborateurs, comparativement aux virus parentaux tumorigènes. L'objectif étant d'avoir des vaccins totalement dépourvus d'effet immunosuppresseurs.

Les infections/vaccinations expérimentales seront menées sur des poussins de 2 jours et se dérouleront dans les deux semaines suivant l'infection, avant le début du développement attendu des tumeurs avec les virus parentaux.

Les moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R seront les suivants :

- Réduction : nous suivons plusieurs paramètres biologiques en parallèle et plusieurs prélèvements seront réalisés sur les mêmes animaux.
  - Raffinement : Afin d'assurer le bien-être des animaux, les expériences se dérouleront avant le début potentiel de la phase tumorale de la maladie de Marek (pour les lots contrôles positifs inoculés avec les virus non atténués). Les poussins seront observés tous les jours afin de repérer d'éventuels signes cliniques, et leur milieu sera enrichi (jouets suspendus).
  - Remplacement : Il n'existe à ce jour aucune véritable méthode *in vitro* pour appréhender l'immunosuppression chez les oiseaux et donc de remplacer l'expérimentation *in vivo*.
- L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation (au maximum) de 102 animaux.

**8583** Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une maladie caractérisée par un déficit en une enzyme appelée ADAMTS13 impliquée dans le clivage du facteur de Willebrand (FvW). En l'absence d'ADAMTS13, le FvW circule sous une forme favorisant l'agrégation des plaquettes. Des thrombi vont ainsi obstruer les vaisseaux du rein, du cerveau mais également du cœur entraînant des défaillances d'organes. Le déficit en ADAMTS13 est, le plus souvent, lié à la présence d'un anticorps dirigé contre cette enzyme. Les progrès thérapeutiques ont amélioré le pronostic mais le taux de mortalité demeure d'environ 20 %. L'endothélium joue un rôle majeur dans la survenue des poussées de la maladie, possiblement via l'activation de récepteurs appelés TLR.

Notre objectif principal est de créer un nouveau modèle d'étude en administrant à des souris les anticorps anti-ADAMTS13 obtenus à partir de patients atteints de PTT et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. L'application de ce modèle à des souris génétiquement déficientes en TLRs, nous aidera à évaluer leur implication dans la dysfonction endothéliale et la genèse de la maladie. Les objectifs secondaires sont d'évaluer deux thérapeutiques ciblant l'IL beta et le TNF alpha, des cytokines modulées par les TLR et connues pour induire une activation endothéliale similaire à celle observée au cours du PTT. Enfin, nous étudierons l'efficacité thérapeutique de l'administration de la protéine recombinante ADAMTS13 sur le retentissement neurologique mais surtout cardiaque de la maladie.

La bonne connaissance du système immunitaire et cardiovasculaire de la souris ainsi que sa proximité phylogénétique avec le système humain permettra d'élaborer un modèle de PTT auto-immun plus proche de la physiopathologie humaine que les modèles génétiquement déficients disponibles actuellement. De même, nous administrerons des anticorps monoclonaux déjà utilisés chez la souris afin de permettre l'émergence de nouvelles thérapeutiques. Pour cette étude expérimentale, 160 souris seront nécessaires pour répondre à l'élaboration du nouveau modèle, son application à des souris génétiquement déficientes en TLRs et l'évaluation des 3 molécules thérapeutiques. Pour réduire le nombre d'animaux nécessaires nous étudierons à la fois les atteintes endothéliale, cardiaque et neurologique dans chacune de ces situations. Ainsi, ce nombre prend en compte les résultats antérieurs ayant permis de raffiner les aspects techniques et les variabilités inhérentes à la création du modèle. Nous réaliserons des mesures non invasives et appliquerons une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses ex vivo pour réduire le nombre d'animaux à sacrifier. Pour limiter l'anxiété, les procédures débuteront après une adaptation de deux semaines après l'arrivée des souris dans l'animalerie. Les manipulations auront lieu sous anesthésie dans une pièce calme par un manipulateur unique. Les données issues des précédents modèles ont permis de montrer que ces modèles donnent des résultats rapidement (sous 36h) avec des symptômes régressant en moins d'une semaine, aucun animal n'ayant nécessité d'euthanasie pour souffrance importante. Néanmoins, leur état physique sera évalué quotidiennement de sorte à ce que l'animal soit euthanasié s'il présente des signes de souffrance (perte de poids >15%, immobilité).

Enfin, dans le cadre de la collaboration avec le laboratoire étranger nous fournissant le FvW recombinant, le comité de protection des animaux de ce laboratoire a approuvé le projet en tant qu'étape préalable à l'acceptation de la fourniture du produit.

**8584** L'intestin constitue une zone d'échanges dans l'organisme mais possède également un rôle de barrière majeur contre des agents pathogènes du milieu extérieur. Grâce aux cellules souches (cellules indifférenciées qui peuvent produire des cellules spécialisées) qui donnent naissance aux différents types cellulaires qui le constituent, c'est le tissu qui se renouvelle le plus rapidement chez les Mammifères. L'intestin est en dialogue constant avec le microbiote qui est formé de l'ensemble des micro-organismes qui colonisent la lumière intestinale. Cet organe à part entière exerce de nombreuses fonctions et il joue en particulier un rôle majeur dans développement et le maintien du système immunitaire de l'hôte. L'intestin ne possède pas qu'une fonction digestive puisqu'il constitue le premier organe de défense immunitaire de l'homme. En effet, plus de la moitié des cellules du système immunitaire sont présentes dans l'intestin et permettraient de tolérer les aliments et bactéries du microbiote, mais jouent surtout un rôle important de défense en s'attaquant aux germes pathogènes.

Ainsi, le rôle de défense de l'intestin est complexe et des perturbations de ce système exposent à des réactions allergiques ou inflammatoires. Par exemple, les maladies inflammatoires chroniques

de l'intestin, comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, se distinguent par une inflammation de la paroi de l'intestin due à une stimulation du système immunitaire, ce qui constitue un facteur de risque pour l'initiation du cancer colorectal. Ce cancer est très fréquent dans les pays industrialisés, il se place au 3ème rang des tumeurs les plus fréquentes chez l'homme et au 2ème rang chez la femme, mais il se situe surtout à la deuxième place en terme de mortalité après le cancer du poumon. L'hétérogénéité des cancers des intestins est aujourd'hui bien reconnue et des efforts importants sont investis pour identifier les cellules de l'intestin qui sont à l'origine de la tumorigenèse intestinale et qui sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier vers les différents types cellulaires présents dans la tumeur. Ces propriétés ne sont pas sans rappeler celles des cellules souches non tumorales. Les cellules souches tumorales sont donc à l'origine de l'ensemble de la masse tumorale et doivent être totalement supprimées afin de permettre la rémission complète du patient. Cependant, ces cellules sont résistantes aux chimiothérapies classiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces cellules sont nécessaires.

L'objet de ce projet est de mieux comprendre le rôle du facteur de transcription (protéine qui régule la transcription d'un gène) Sox9 dans l'épithélium intestinal dans un contexte sain et tumoral. Dans l'intestin, Sox9 est exprimé dans différents types cellulaires, en particulier les cellules souches, mais son rôle n'est pas clairement identifié. En contexte tumoral, il a été montré que ce facteur est surexprimé par les cellules tumorales dans les cancers colorectaux, mais le rôle de Sox9 dans les cellules souches (identifiées comme cellules à l'origine des tumeurs) reste inconnu. Ces études permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la fonction des cellules souches intestinales saines qui restent encore à mieux comprendre. En parallèle, les études en contexte tumoral ouvriront la voie vers l'identification de nouveaux marqueurs de pronostic et de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les cellules souches tumorales.

Ce projet requiert une analyse intégrée des communications qui existent entre l'épithélium intestinal, les cellules du système immunitaire et le microbiote. Le rôle de Sox9 sera appréhendé par une approche de physiologie intégrative à l'aide de modèles de souris conduisant à l'inactivation de ce gène, au cours de la vie adulte, de façon ciblée dans les différents types cellulaires qui l'expriment. Nous utiliserons 8 lignées de souris transgéniques, soit un total d'animaux estimé à 1070 individus, sur une durée totale de projet de 5 années. Notre démarche s'inscrit dans le respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 (« règle des 3R ») : 1/ Remplacement : nos études nécessitent une approche de physiologie intégrée, cependant, dans la mesure du possible, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires modulés par Sox9 fera appel à des cultures organotypiques primaires d'épithélium intestinal dérivées des différents modèles murins afin de remplacer et limiter le nombre d'animaux utilisés ; 2/ Réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et les élevages seront utilisés au mieux puisque les études seront menées sur des mâles et femelles, et la majorité des génotypes produits seront utilisés ; 3/ Raffinement : les animaux feront l'objet d'une surveillance régulière par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Afin de réduire au maximum la douleur et l'angoisse que certains protocoles pourraient engendrer chez les animaux, des points limites ont été définis. En cas d'atteinte d'un point limite, de signes de détresse ou de douleur, les animaux seront sortis du protocole, euthanasiés et autopsiés. Tous les animaux auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture à volonté, et leur milieu sera enrichi à l'aide de carrés de coton pour la construction d'un nid, ainsi que de litière mélangée à des copeaux.

**8585** Nous souhaitons étudier les modifications d'activité de l'axe corticotrope et précisément de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau hépatique et hippocampique, et leurs éventuelles implications dans des modifications comportementales associées au diabète (DT1) chez le raton de 21 jours (n=336 Sprague Dawley). Nous souhaitons étudier l'implication de l'axe corticotrope dans les troubles cognitifs liés au diabète par la pratique de surrénalectomies suppléées ou non par des traitements substitutifs avec différentes doses de corticostérone par l'eau de boisson, ou par l'administration d'antagonistes de la 11 $\beta$ -HSD1, et la mesure de leurs conséquences sur le comportement et la morphologie cérébrale des animaux diabétiques.

Remplacement : Les questions posées nécessitent de travailler in vivo (modèles de DT1) et ne permettent pas de transposer les expérimentations sur culture cellulaire. L'effet de l'induction du diabète de type 1 (ou de l'insuline) est étudié au niveau comportemental (n=12 rats par groupe expérimental). De ce fait, l'utilisation d'animaux est indispensable pour la compréhension des mécanismes physiologiques.

Réduction : Les études comportementales nécessitent l'utilisation d'au minimum 12 animaux par groupe afin de réaliser les analyses statistiques adéquates.

Raffinement : la méthodologie utilisée (induction du DT1 par streptozotocine, Procédure 1) est très efficace et permet de réduire le nombre d'animaux ne répondant pas au traitement (qui devraient être recyclés ou euthanasiés). Les mêmes rats seront soumis à plusieurs explorations biologiques et plusieurs test comportementaux. Les points limites ont été clairement identifiés (forte perte de poids, prostration) afin de limiter la souffrance des diabétiques. Les rats sont hébergés 2 par cage, avec un enrichissement (tube ou bâton de bois) durant toute l'expérimentation. La litière des rats est changée quotidiennement car les diabétiques présentent une polyuro-polydipsie. Une surveillance particulière de leur approvisionnement en eau et en nourriture a été mise en place (animaliers, étudiants et chercheurs).

Avantages : Les résultats attendus permettront une meilleure compréhension des effets négatifs du DT1, et ouvriront des pistes quant aux possibles traitements de ces effets chez l'enfant. Dommages escomptés : le nombre d'animaux diabétiques non traités par insuline est réduit au maximum, la souffrance de ces animaux étant modérée mais existante.

**8586** L'objectif des protocoles d'immunisations cobaye est la production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, qui sont utilisés à des fins scientifiques et médicales. Les applications pour l'utilisation des anticorps peuvent être diverses comme par exemple :

- fabrication de tests de diagnostic permettant la détection de maladies en médecine humaine
- réparation de médicaments pour usage en médecine humaine (médicaments biologiques)
- applications diverses en recherche et développement.

Le nombre d'animaux utilisés par antigène peut varier en fonction des études selon la quantité d'anticorps désirée par le scientifique, il est en moyenne de 10 animaux.

Une trentaine de procédures d'immunisation cobayes peuvent être réalisées par an, soit 300 animaux par an ce qui fait 1500 animaux pour la totalité du projet.

La communauté scientifique s'engage par écrit avant chaque procédure à nous sous-traiter des productions d'anticorps ne pouvant être réalisées in vitro dans l'état de l'art, ainsi qu'à utiliser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à la quantité d'anticorps désirée.

La production d'anticorps sur cobayes est réalisée par administration d'antigène accompagné ou non d'adjuvant, puis récolte de sang, sérum, plasma ou d'organes des animaux pour envoi au scientifique qui pourra réaliser la purification et l'extraction des anticorps d'intérêt.

Les animaux sont maintenus en groupes sociaux dans un milieu enrichi. Une observation journalière des animaux est réalisée depuis leur réception jusqu'à la fin de l'étude, et des points limites sont mis en place, afin de garantir leur bien-être tout au long de l'étude.

**8587** Le métabolisme cellulaire, c'est à dire la façon de se nourrir des cellules tumorales, et le réseau sanguin des tumeurs sont fondamentalement différents de ceux observés dans les organes sains. En effet, lorsque les cellules tumorales se divisent, oxygène et nutriments viennent rapidement à manquer, tandis que des déchets toxiques sont produits en grande quantité. Les tumeurs provoquent alors la création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Ce phénomène a amené le développement de traitements, dits anti-angiogéniques, ayant pour but de détruire le système vasculaire tumoral et ainsi d'asphyxier et d'affamer la tumeur. Malgré les grands espoirs suscités par ces approches, certaines cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à cette destruction du système vasculaire en modifiant leur métabolisme. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements anti-angiogéniques, notre étude a pour objectif :

(1) d'étudier chez la souris la relation dynamique qui lie au sein des tumeurs le réseau vasculaire et le métabolisme au cours de la croissance tumorale et au cours de la réponse à un traitement anti-angiogénique,

(2) d'étudier l'effet d'un traitement anti-métabolique seul ou combiné avec l'approche anti-angiogénique,

(3) d'étudier la cardiotoxicité induite par ces traitements par imagerie échographique.

Cette étude ne pouvant se faire qu'in vivo, l'utilisation de modèles murins est nécessaire.

Sous anesthésie générale, pour éviter toute souffrance, nous implanterons des tumeurs aux souris avant d'administrer les traitements. Les souris seront ensuite suivies en imagerie avec des techniques non invasives et non douloureuses, similaires aux techniques utilisées chez l'homme en clinique : imagerie par ultrasons et imagerie nucléaire (TEP scan). Durant les séances d'imagerie, les souris seront anesthésiées pour éviter qu'elles ne bougent. Dans un principe de réduction, chaque souris sera son propre témoin.

720 souris seront nécessaires pour pouvoir tester les molécules thérapeutiques et mener à bien ce projet de 3 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum.

Le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement afin de réduire au maximum les souffrances liées aux procédures. En cas de non récupération de l'animal, une euthanasie anticipée sera pratiquée.

Cette étude devrait permettre : (1) de mieux comprendre comment les cancers adaptent leur réseau vasculaire et leur façon de se nourrir en réponse aux traitements anti-angiogéniques, (2) de définir des marqueurs ou caractéristiques d'imagerie permettant de classer les cancers au moment de leur détection entre tumeurs pouvant répondre favorablement aux traitements et tumeurs résistantes, et (3) de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant le métabolisme tumoral en complément de la destruction du réseau vasculaire.

**8588** Les douleurs chroniques sont très fréquentes et les traitements disponibles souvent peu efficaces. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs chroniques. En effet, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, et douleurs provoquées par une stimulation normalement non douloureuse (allodynie) ou douloureuse (hyperalgésie). Chaque symptôme dépendant de mécanismes distincts, un médicament efficace sur l'un ne le sera donc pas nécessairement sur un autre : d'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun d'eux.

Nous nous intéressons aux mécanismes de l'allodynie mécanique, un des symptômes les plus fréquents observés chez les patients douloureux chroniques. Comment le toucher devient-il douleur ? Normalement, ces sensations sont indépendantes. Les nerfs véhiculant les messages douloureux se terminent dans les couches superficielles de la moelle épinière et ceux véhiculant les messages tactiles dans les couches profondes. Cependant, suite à une lésion nerveuse ou une inflammation périphérique, les informations tactiles peuvent accéder aux neurones de la douleur des couches superficielles via un 'court-circuit' et provoquer ainsi une allodynie mécanique. Un petit nombre de neurones appartenant à ce circuit a été identifié, mais le manque d'informations concernant le réseau dans son ensemble et ses caractéristiques propres constituent une barrière majeure contre la mise en place d'une thérapeutique ciblée et efficace. Quels sont les autres neurones ? Comment l'information tactile se propage-t-elle à travers ce circuit ? Grâce à des traceurs transsynaptiques viraux injectés chez des souris génétiquement modifiées pour faire exprimer ces virus uniquement dans des sous-populations de neurones, nous déterminerons la connectivité synaptique des populations neuronales existant au niveau de la corne dorsale et déterminerons leur potentiel thérapeutique à l'aide de vecteurs pharmacogénétiques. Les résultats permettront d'aider au développement de thérapies spécifiques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant de faire exprimer des virus conditionnels au niveau de la moelle épinière est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation d'animaux dans ce protocole : en effet, il est nécessaire de réaliser ces études chez l'animal car l'intégration du toucher et de la douleur implique de nombreux neurones organisés en réseaux complexes et méconnus du système nerveux central et périphérique. Pour chaque animal, nous réaliserons une injection intraspinale d'un seul virus. Les souris injectées avec un virus transsynaptique seront analysées post-mortem. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal par injection d'une dose létale de pentobarbital est nécessaire. Les souris injectées avec les virus pharmacogénétiques seront analysées à l'aide d'une batterie de tests comportementaux en

conditions physiologiques ou dans des modèles de douleur inflammatoires ou neuropathiques. Le nombre de souris par groupe (n=20) est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux chroniques (soit induit par injection sous-cutanée d'un composé appelé "adjuvant complet de Freund" (CFA) pour les douleurs inflammatoires, soit par écrasement d'une racine nerveuse (constriction nerveuse chronique ou CCI) pour les douleurs neuropathiques). Le modèle inflammatoire CFA, largement utilisé au cours de recherches sur les mécanismes de la douleur, provoque l'apparition d'une hypersensibilité cutanée persistante. De même, le modèle CCI mime la constriction chronique nerveuse observées chez de nombreux patients neuropathiques atteints de lésions nerveuses et qui est responsable d'une hypersensibilité dans le, et autour du, territoire lésé. L'utilisation d'autres modèles de douleur pourra être envisagé afin d'étendre les résultats de l'étude à différentes conditions pathologiques.

Le nombre de souris expérimentales est de 100 (20 pour le traçage transynaptique antérograde, 20 pour le traçage transynaptique rétrograde et 20 contrôles + 20 douleurs inflammatoires + 20 douleurs neuropathiques pour l'étude comportementale) par lignée transgénique. Pour l'étude comportementale, chaque animal est son propre contrôle (avant versus après activation pharmacogénétique) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un contrôle et une qualité suffisante à l'expérimentation. Chaque animal sera testé à l'aide d'une série de stimulations mécaniques et thermiques ce qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Nous utiliserons un nombre équivalent d'animaux mâles et femelles en respect de la règle des trois "R" et des directives sur la Recherche Animale. La mise en place technique du projet nécessitera un nombre de 20 souris afin de s'assurer de l'infection de populations spécifiques de neurones dans la corne dorsale après injection de vecteurs viraux a bien été réalisée. Afin d'obtenir un nombre suffisant de souris, il sera nécessaire de mettre en place des couples reproducteurs (10 souris réparties en 5 couples de 2 par lignée transgénique). Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc de 130 souris adultes par lignée transgénique. Chaque lignée Cre ne présente pas le même taux d'infectivité par les différents virus utilisés. Une mise au point pour chaque lignée Cre est nécessaire. Chaque lignée Cre nécessite donc 130 animaux. 5 Lignées seront utilisées soit un total de  $130 \times 5 = 650$  animaux. L'étude correspondant à ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 15% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique de la Recherche sur la douleur.

**8589** Le cancer colorectal reste, en France, le 2ème cancer en terme de mortalité tout sexe confondu. Bien que l'étiologie exacte des cancers intestinaux reste peu claire, l'induction d'une inflammation chronique par les bactéries du microbiote intestinale a été démontrée dans plusieurs modèles comme un mécanisme pouvant être à l'origine de ces cancers intestinaux et notamment les cancers colorectaux.

Le Transforming growth factor- $\beta$ , une cytokine particulièrement produite au sein du tube digestif, participe à la régulation de l'inflammation muqueuse et de l'activation des lymphocytes T. Les personnes atteintes d'une mutation du gène SMAD4 sont prônes à développer des polypes évoluant vers des cancers. De façon intéressante, chez la souris, il a été montré que la délétion spécifique de SMAD4, au sein des lymphocytes T induit une inflammation intestinale chronique évoluant en cancer de la muqueuse intestinale après l'âge de 8 mois. Ces animaux développent une inflammation chronique de tout l'intestin et particulièrement des adénocarcinomes au niveau de la jonction du duodénum et de l'estomac, ceci sans exposition à un carcinogène spécifique. Cependant, les mécanismes moléculaires, cellulaires et microbiologiques restent encore peu définis. Ainsi notre étude sera de comprendre ces mécanismes impliqués dans l'établissement de l'inflammation chronique et l'induction de tumeurs dans ces souris.

Dans un premier temps, nous déterminerons les lymphocytes à l'origine de l'installation de cette pathologie. Dans un deuxième temps, nous chercherons à déterminer les mécanismes moléculaires induisant cette pathologie inflammatoire intestinale et la transformation tumorale. Enfin, nous déterminerons le rôle de la flore microbienne dans le développement de l'inflammation chronique et l'émergence de tumeurs.

Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant des nouveaux mécanismes responsables du cancer suite à l'activation des lymphocytes par le microbiote, qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers l'utilisation d'antibiotiques ciblés comme agents thérapeutiques d'une inflammation à l'origine de cancers. Seules des études chez la souris, pour qui les réactifs sont adaptés, et la caractérisation du microbiote bien décrite, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques adéquates. Des groupes de 5 à 7 animaux adultes, d'âge et de sexes similaires, par expérience, seront réalisés. Des études statistiques appropriées seront effectuées permettant de réduire également l'effectif des animaux. Un contrôle journalier sera effectué pendant toute la durée de l'expérimentation, au cours duquel une pesée et un examen des signes cliniques évocateurs de souffrance seront recherchés. Des points limites permettant d'anticiper une douleur modérée ont été définis. Si une prostration, une diarrhée, un prolapsus rectal ou une perte de poids supérieur à 20% est constatée, la souris sera immédiatement euthanasiée et les organes seront prélevés pour analyse. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie à l'isoflurane pour diminuer le stress des souris. Pour ce projet, 772 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans (72 pour le maintien de la lignée et 700 pour l'expérimentation).

**8590** La formation des personnes qui utilisent des animaux à des fins scientifiques est obligatoire, et la réglementation française prévoit un système d'approbation pour des formations spécifiques, de façon à respecter des recommandations nationales en termes de programme et d'utilisation d'animaux pour des enseignements pratiques. Notre projet vise, dans ce cadre, à enseigner les pratiques peu ou pas invasives (sans douleur ni stress) recommandées pour l'utilisation des rongeurs et des lapins.

La formation est organisée régulièrement pendant les 5 ans du projet, pour un public d'étudiants de l'enseignement supérieur qui se destine à la recherche biomédicale ou fondamentale, et pour des personnels techniciens et chercheurs en poste : elle est structurée comme un module indépendant qui n'accueille que des participants volontaires, avec une grande part de cours mais aussi de travaux dirigés et d'échanges. Pendant la formation, des travaux pratiques permettent d'acquérir les bases de la manipulation, de l'administration de substances et du prélèvement sanguin dans ces espèces. L'accent est porté sur le recours à des techniciens formateurs qualifiés et sur de bonnes conditions de formation (effectif limité, locaux adaptés à l'enseignement en présence d'animaux.).

Les animaux sont hébergés conformément aux pratiques recommandées, en groupes sociaux et avec un enrichissement adapté à l'espèce, et bénéficient d'une acclimatation avant leur utilisation. Chaque espèce est utilisée dans un atelier séparé sous la responsabilité d'un enseignant.

Les stagiaires pratiquent les gestes pratiques suivants (Chaque technique est d'abord démontrée par un enseignant, puis réalisée par les participants sous supervision) : manipulation, identification, contention, administration de substances par voie orale ou injectable (sous cutané, intramusculaire, intraveineuse.), prélèvement sanguin. Une démonstration d'anesthésie volatile est réalisée, ainsi qu'une démonstration de l'euthanasie par surdosage d'anesthésique chez la souris.

La démarche de remplacement est considérée grâce au recours préalable à des vidéos, des pièces anatomiques et à un mannequin d'enseignement, ce qui limite l'utilisation de l'animal au minimum ; il est néanmoins nécessaire que cette phase avec animal soit réalisée à la fois pour enseigner la prise en compte de la réaction de l'animal et pour assurer une acquisition de compétences adaptées à l'objectif de formation professionnelle. Les trois espèces sont choisies en raison de leur utilisation majoritaire dans les domaines de recherche visés par les étudiants ; pour la plupart des besoins de formation, une seule espèce parmi les trois pourra être utilisée. Toutes formations confondues (environ 500 personnes pendant 5 ans) nous estimons que nous utiliserons au maximum 500 souris, 150 rats et 20 lapins.

La démarche de réduction est considérée en n'utilisant qu'une ou deux espèces et pas les 3 si cela suffit à l'objectif d'apprentissage pour le groupe de formation. Le nombre d'animaux est réduit au



minimum, sur la base du nombre de personnes à former et du nombre de démonstrations prévues par groupe de formation, en choisissant le compromis acceptable pour éviter d'effectuer trop de manipulations et d'injections par individu. La gravité des procédures sera classée légère ou modérée selon que les animaux recevront moins de 2 injections ou plus. Les animaux pourront être réutilisés pour une seconde séance de formation dans le cas de procédure légère.

La démarche de raffinement est considérée en s'attachant à conseiller les techniques les moins invasives en accord avec les recommandations professionnelles publiées (petits volumes d'administration, prélèvement sanguin sous anesthésie locale ou générale.). De ce fait, l'enseignement n'occasionne pas de douleur aux animaux. Les enseignements sont organisés en petit groupe, avec un ratio enseignant/stagiaire élevé pour s'assurer que chaque geste est bien réalisé. Les stagiaires sont conscients des précautions à prendre pour respecter le bien-être des animaux.

**8591** Nous évaluons pour des partenaires industriels différentes préparations destinées à maintenir à distance des espèces animales susceptible de provoquer des dégâts sur divers équipements (ou simplement indésirables). Ceci s'intègre dans un ensemble de collaboration plus vaste dans lesquels nous évaluons également l'appétence de certaines des espèces en question pour différents matériaux. Cet évaluation d'appétence ne fait pas l'objet d'une demande d'autorisation de projet car l'effet adverse de l'exposition à un matériau inappétent est mineur : l'animal ignore simplement le matériau. Si le matériau est appétent, il devient un élément d'enrichissement.

En revanche la situation des animaux inclus dans le présent projet (qui vise à évaluer des substances chimiques ajoutées à des matériaux ou vaporisées sur ceux ci ou encore placées au sol) est différente car ces substances sont supposées présenter des caractéristiques désagréables pour les animaux.

Nous envisageons trois types d'essais :

i- effet du produit répulsif sur l'appétence de matériaux placés dans les cages des animaux et utilisés par ceux-ci de façon destructive lorsque non-traités

ii- position spatiale d'animaux dans un enclos adapté à leur taille en présence d'un répulsif ou d'une association répulsif et stimulus attractif

iii- efficacité d'une barrière répulsive placée entre l'animal et un stimulus attractif.

Pour ce type d'essais portant sur le comportement d'animaux sauvages, il est impossible de se passer de recherche utilisant des animaux. Nous utilisons des espèces apparentées aux espèces sauvages visées pour classer les produits, les essais terrain devant ultérieurement valider une efficacité sur les espèces animales visées.

Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, nous envisageons avant tout de ne pas réaliser d'étude statistique mais de classer les produits en fonction de leur efficacité en fonction des catégories de tests. Pour cela, il suffit de 4 animaux pour comparer entre eux deux produits efficaces et pour déterminer si un processus d'habituation est à l'œuvre. Pour les 5 années du présent projet et pour tester 6 préparations par an, un nombre de 60 animaux de chacune des espèces (rats, furets et deux espèces de serpents) sera nécessaire soit un maximum de 240 animaux. Ces animaux seront soit utilisés à d'autres fins scientifiques à l'issue de ce projet soit placés. Pendant toute leur présence dans l'établissement les animaux bénéficieront d'un enrichissement du milieu correspondant à leur espèce (objets manipulables, hébergement en groupe).

Nous n'envisageons pas de tester de produits irritants pour les animaux (car ces produits doivent pouvoir être manipulés par l'homme) et l'impact sera essentiellement lié à l'exposition à des substances volatiles désagréables - mauvaises odeurs. Si le produit déclenchait un comportement indiquant un inconfort manifeste chez l'animal, l'essai serait interrompu.

**8592** L'utilisation d'implants dentaires insérés dans l'os alvéolaire permet de remplacer les racines dentaires absentes et de fixer des prothèses dentaires aux patients édentés. Cette méthode est aujourd'hui validée par la communauté scientifique. La principale limite technique actuelle à la mise en place d'implants dentaires est un volume osseux insuffisant et il est alors nécessaire de procéder à des greffes osseuses. La résorption osseuse des maxillaires est un phénomène naturel lié à divers facteurs locaux ou généraux. Il est possible de limiter cette résorption osseuse grâce au comblement des alvéoles dentaires au moment de l'extraction de la dent, à l'aide d'os autogène ou de

biomatériaux. L'os autogène est le plus efficace, mais son prélèvement peut entraîner des complications locales et il n'est disponible qu'en quantité limitée. Des biomatériaux naturels ou synthétiques peuvent également être utilisés. Les biomatériaux disponibles permettent de guider la formation osseuse (ostéo-conduction) mais ils n'induisent pas la régénération osseuse (ostéo-induction). Les matériaux sous forme de poudre ou de granules sont souvent difficiles à manipuler, aboutissant à un comblement parfois incomplet ou excessif.

Le développement d'un matériau injectable possédant des propriétés d'ostéo-conduction et d'ostéo-induction ainsi qu'une manipulation aisée est l'objectif général de ce projet.

Nous avons montré dans des études préalables qu'un biomatériau composite (polymère - phosphate de calcium) sous forme de blocs était ostéo-conducteur et ostéo-inducteur chez le petit et le gros animal. Ce matériau a été rendu injectable et les résultats sur le petit animal (rat) ont montré qu'une régénération osseuse complète apparaissait à son contact. Des études préliminaires sur la brebis ont montré une néoformation osseuse importante dans le modèle d'élévation du plancher sinusien (sinus lift) avec un volume osseux équivalent voire supérieur à un matériau de référence. Afin d'améliorer encore ce matériau injectable composite, nous avons modifié sa composition en augmentant la quantité de charges minérales en son sein afin d'améliorer encore la néoformation osseuse. Il est maintenant nécessaire d'évaluer que la mise en place d'implants dentaires en titane (modèles commerciaux) est possible dans le volume osseux néoformé et que ces implants s'intègrent de façon équivalente dans l'os résultant du comblement réalisé avec le matériau test et de celui réalisé avec le matériau contrôle. Il existe actuellement deux modalités pour la mise en place des implants dentaires après comblement sous-sinusien : soit les implants sont mis dans le même temps opératoire, soit ils sont placés après cicatrisation de la greffe osseuse (6 mois après la première intervention le plus souvent).

Douze brebis seront utilisées pour cette expérimentation. Le modèle chirurgical qui sera réalisé est celui du comblement du plancher du sinus maxillaire (Sinus Lift) avec mise en place simultanée ou différée des implants dentaires. Dans le groupe « mis en place simultanée », les implants seront placés dans le même temps opératoire que le comblement osseux et un temps de cicatrisation de 6 mois sera observé avant euthanasie et prélèvement des échantillons. Dans le groupe « mise en place différée », les implants seront placés lors d'une seconde intervention, 6 mois après l'intervention de comblement osseux.

Une période de cicatrisation de 3 mois sera observée après mise en place des implants, puis les échantillons seront prélevés. Un matériau de comblement contrôle de référence (produit commercial) sera utilisé dans tous les cas. Nous pourrions évaluer 6 échantillons par condition après l'euthanasie des animaux et le recueil des échantillons. La brebis est le meilleur modèle pour l'étude de la régénération osseuse pré-implantaire du sinus maxillaire.

Il est indispensable de réaliser cette expérimentation avant de passer à des essais cliniques chez l'homme afin de valider l'efficacité de ce matériau dans cette indication. Le nombre d'animaux a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante permettant de conclure sur l'efficacité de cette procédure. Les expérimentations seront conduites dans un établissement spécialisé, habitué à la gestion de ce type d'animaux et de chirurgies et possédant une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires qui travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

L'analgésie post-opératoire et le suivi des animaux seront effectués par des vétérinaires spécialisés. Les points limites ont été définis dans le protocole.

**8593** L'ocytocine et la vasopressine sont deux hormones secrétées par le cerveau et connues pour réguler les comportements sociaux et affectifs (empathie ou agressivité, relation mère-enfant, choix des partenaires, stabilité du couple ...). De nombreuses études cliniques sont actuellement menées chez l'homme dans lesquelles l'ocytocine est utilisée dans l'espoir de corriger les troubles de l'humeur ou les comportements sociaux, en particulier dans les cas d'autisme ou du syndrome de Prader Willi. Cependant, le mode d'action de ces deux hormones dans le cerveau est inconnu, qu'il s'agisse de la localisation des zones affectées ou des mécanismes moléculaires mis en jeu. Ce projet vient en complément de notre étude en cours qui vise à déterminer le mode d'action de ces deux hormones dans une région cérébrale particulièrement impliquée dans la régulation des comportements sociaux :

le Septum latéral. Nous savons qu'un comportement social engendre des changements dans l'électroencéphalogramme (EEG) et que le septum est l'une des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'EEG. Pour comprendre le mode d'action de ces hormones, nous analysons leur influence sur les rythmes EEG de souris libres de leurs mouvements, en interaction ou non avec des congénères. Nous avons déjà obtenu des résultats très encourageants en combinant l'injection d'agonistes et d'antagonistes de l'ocytocine et de la vasopressine dans le septum latéral, pendant un comportement d'interaction sociale. Cependant, les résultats obtenus à partir de ces injections nécessairement assez massives de molécules exogènes, demandent confirmation en manipulant plus précisément la libération des molécules endogènes par une approche optogénétique. De plus, afin d'étudier l'implication du septum latéral dans un cadre pathologique, nous souhaitons reproduire une partie des expériences sur un modèle présentant des troubles sociaux : les souris *Magel2KO*. En effet, ces souris présentent une diminution du nombre de récepteurs de l'ocytocine spécifiquement dans le septum latéral. De plus, cette diminution est corrigée par un traitement à l'ocytocine au cours de la première semaine de vie, qui permet également de soigner les troubles sociaux. Nos travaux menés précédemment *in vitro* indiquent que le réseau des neurones du septum est modulé par l'ocytocine et la vasopressine. Nous devons donc aussi vérifier ici qu'il y a une corrélation entre le comportement animal, l'EEG et l'activité du réseau en étudiant la modulation des neurones septaux par l'ocytocine et la vasopressine dans des tranches de cerveau *ex vivo*.

L'objet de la présente demande, qui concerne 790 animaux en tout, consiste donc en une série d'expérimentations au cours desquelles l'EEG de souris éveillées ou l'activité électrique du réseau neuronal seront enregistrés avant, pendant et après stimulation ou inhibition de la libération d'ocytocine ou de vasopressine par une approche d'optogénétique, ou bien d'injections intracérébrales d'agonistes et d'antagonistes de l'ocytocine et de la vasopressine pour l'étude de la situation physiopathologique. Lorsque cela est possible, en particulier dans le cas des injections intracérébrales de substances pharmacologiques, chaque souris ou chaque cellule servira de test et de contrôle (injection de substances actives ou de NaCl) afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre des résultats statistiquement significatifs. Ces résultats devraient améliorer notre connaissance du mode d'action central de ces deux hormones et servir de base pour raffiner les protocoles utilisés actuellement chez l'homme de façon empirique pour traiter des pathologies très invalidantes comme l'autisme ou le syndrome de Prader Willi. Les souris seront élevées avec libre accès à l'eau et à la nourriture. L'enrichissement sera représenté par des copeaux de bois ajoutés à la sciure dans la cage, ainsi qu'un carré de cellulose. Toutes les expériences que nous pratiquerons sur les souris suivront les recommandations du Gircor (Guide l'évaluation éthique) et de la Charte pour une éthique de l'expérimentation animale. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les mesures suivantes seront prises : les animaux seront opérés sous anesthésie profonde ; après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil. Si les animaux ont perdu du sang pendant la chirurgie, nous administrerons une solution saline en sous cutané. Les animaux seront ensuite stabulés en cage transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance. Un analgésique sera administré dilué dans l'eau des biberons pour éviter la douleur possible liée à la cicatrisation du site d'injection. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection (écoulement, rougeur ou enflure au niveau de la zone de cicatrisation) seront traités avec des antibiotiques dans l'eau de boisson.

- 8594** Les lymphocytes sont des cellules du système immunitaire qui ont un rôle majeur dans la défense contre les agents pathogènes mais ils sont également en étroite interaction avec les bactéries du système digestif (microbiote intestinal). De nombreuses maladies inflammatoires ont été associées à une dérégulation de cette interaction, il est donc important d'en comprendre les modalités. Les différentes fonctions des lymphocytes reposent sur leur capacité à reconnaître des molécules présentes à la surface ou à l'intérieur des bactéries : les antigènes. Les lymphocytes MAIT (pour Lymphocytes T invariants associés aux muqueuses) reconnaissent un antigène produit au cours de la synthèse de la riboflavine (Vitamine B2), le 5-OP-RU. Cette voie de synthèse est présente chez environ 80% des bactéries, dont certaines bactéries du microbiote intestinal.

Il a été montré chez des souris axéniques, c'est-à-dire dépourvues de tout micro-organisme et élevées dans un environnement stérile, que le développement des lymphocytes MAIT dans le thymus est bloqué à un stade très précoce. Notre projet vise à déterminer l'influence du microbiote intestinal sur le développement des lymphocytes MAIT. L'hypothèse testée est que le 5-OP-RU produit par le microbiote est nécessaire pour leur développement dans le thymus.

Dans une première expérience, nous déterminerons si la voie de synthèse de la riboflavine chez les bactéries du microbiote est nécessaire pour le développement des lymphocytes MAIT. Pour cela, des souris axéniques seront colonisées soit avec une espèce bactérienne possédant la voie de synthèse de la riboflavine, soit avec une espèce bactérienne ne possédant pas cette voie. Dans une deuxième expérience, nous chercherons à démontrer l'effet spécifique du 5-OP-RU dans le développement des lymphocytes MAIT. Pour répondre à cette question, nous coloniserons des souris axéniques avec l'une des trois souches bactériennes suivantes : une souche naturelle qui produit du 5-OP-RU et de la riboflavine, une souche mutée qui produit du 5-OP-RU mais pas de riboflavine, et une souche mutée qui ne produit ni l'un ni l'autre. Nous vérifierons aussi que l'apport extérieur de riboflavine par l'alimentation n'a pas d'effet sur le développement des lymphocytes MAIT. Pour cela, nous utiliserons des souris colonisées avec l'une ou l'autre des deux souches mutées capable ou incapable de produire du 5-OP-RU et nous ajouterons de la riboflavine dans leur eau de boisson. Nous ne devrions pas observer de lymphocytes MAIT chez les souris colonisées avec la bactérie ne produisant pas le 5-OP-RU, même si elle reçoit un apport exogène de riboflavine.

Des expériences préliminaires ont montré que, chez des souris conventionnelles (c'est-à-dire hébergeant un microbiote normal dans leur tube digestif), chez lesquelles une modification génétique a aboli le développement des lymphocytes MAIT, l'administration de 5-OP-RU relance ce développement. Nous souhaitons réaliser la même expérience chez des souris axéniques (naturellement dépourvues de lymphocytes MAIT) en utilisant deux voies d'administration : la voie orale (gavage), pour mimer l'arrivée de la molécule par voie digestive, et la voie intra-péritonéale, pour pallier une dégradation potentielle de la molécule dans l'estomac.

Il a été également démontré que les souris conventionnelles génétiquement modifiées pour ne pas produire de cellules MAITs sont plus sensibles à un traitement induisant une inflammation de l'intestin. Notre hypothèse est que leur sensibilité accrue à l'inflammation serait due à l'absence de MAITs, et donc à l'absence de production de 5-OP-RU. Pour évaluer l'effet protecteur du 5-OP-RU, nous allons comparer la réponse au traitement inflammatoire de souris colonisées soit avec une souche bactérienne capable de produire le 5-OP-RU, soit avec une souche incapable de produire ce métabolite.

Les résultats de ces expériences seront obtenus en quantifiant le nombre de cellules MAITs dans le thymus, la rate et les poumons (lieux de production des MAITs).

Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet ; il ne peut être remplacé par des modèles in vitro car le processus étudié nécessite l'analyse de tissus lymphoïdes en réponse à des microbiotes digestifs différents. Le nombre de souris a été calculé pour utiliser le minimum d'animaux possible afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs, à savoir 6 souris par groupe pour les 4 premières expériences, et 11 par groupe pour la cinquième. Sur cette base, nous utiliserons 213 animaux au total. Aucune souffrance ou angoisse n'est attendue pour les 4 premières expériences car les souches bactériennes utilisées sont des bactéries commensales du tube digestif, dépourvues de pouvoir pathogène, et les molécules utilisées (riboflavine et 5-OP-RU) sont dépourvues de toute toxicité. L'inflammation déclenchée dans la cinquième expérience entraînera une douleur abdominale modérée de quelques jours. Le protocole que nous utiliserons est éprouvé, un examen clinique poussé sera effectué tous les jours de l'expérience, et des points limites seront définis, à partir desquels le protocole serait arrêté pour les éventuelles souris concernées.

**8595** L'arthrose, dans le contexte d'une population vieillissante, a un impact majeur sur la qualité de vie des patients et constitue un véritable problème de santé publique dans les pays occidentaux. L'arthrose se caractérise par une dégradation progressive des articulations, se traduisant principalement par des douleurs et une limitation fonctionnelle, atteignant l'ensemble des structures de l'articulation, telles que le cartilage, les ligaments, et le ménisque.

Les progrès menés dans la compréhension de l'arthrose ont permis d'identifier des cibles thérapeutiques prometteuses visant à prévenir ou à ralentir la progression de la maladie. Mais malgré d'intenses recherches dans ce domaine, aucune approche pharmacologique n'a démontré d'efficacité thérapeutique. A ce jour, le seul critère d'évaluation de cette efficacité reste le temps écoulé avant le remplacement total de l'articulation par chirurgie. Il apparaît que la recherche et le développement de thérapies efficaces sont limités par le manque d'outils d'imagerie sensibles et spécifiques permettant la quantification réelle de la progression de l'arthrose et l'évaluation de la réponse thérapeutique.

Dans ce contexte, ce projet propose la validation d'une nouvelle approche de ciblage du cartilage par imagerie, qui ouvrira la voie à une méthode non invasive d'imagerie fonctionnelle des articulations en médecine nucléaire. La stratégie de ciblage du cartilage se base sur l'utilisation d'un nouveau traceur radioactif. Sur la base de nombreuses études précliniques, nous pensons que notre traceur est un sérieux candidat pour une imagerie sensible et fonctionnelle du cartilage en médecine nucléaire : sa sensibilité et sa spécificité permettront de quantifier des critères fonctionnels au niveau du cartilage, permettant ainsi à la fois 1) une évaluation des signes précoces de la pathologie et 2) l'évaluation de sa progression et de l'efficacité des nouvelles approches thérapeutiques.

Afin de démontrer cette hypothèse, notre projet a été soumis avec succès à l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) dans la cadre des appels à projets génériques 2015. Au niveau préclinique, les objectifs de notre projet sont :

(i) Déterminer la pertinence de notre traceur pour la mise en évidence par imagerie de l'arthrose dans des modèles murins : diagnostic et suivi de la pathologie par imagerie.

(ii) Comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres modalités d'imagerie permettant l'évaluation du volume de cartilage.

(iii) Déterminer la pertinence de l'imagerie pour l'évaluation des nouvelles approches thérapeutiques : le choix se portera sur des approches apparues récemment comme prometteuses au niveau clinique. Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3Rs, utilisant des conditions d'hébergement, de bien-être animal et un nombre de souris optimisés.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner), utilisant des conditions de stabulation, de bien-être animal et un nombre de souris optimisés. Une observation journalière des animaux est assurée par la personne chargée de l'expérimentation. Cette observation consiste à vérifier l'état et le comportement général des souris. Lors des procédures expérimentales, les souris seront placées sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation.

L'ensemble du projet comprendra 144 souris sur 24 mois.

**8596** L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches qui touche en France environ 6% de la population et qui est à l'origine de 1000 décès par an. On le définit comme une gêne respiratoire plus ou moins sévère due à une réaction du système immunitaire du patient à la présence d'un allergène. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'asthme allergique sont complexes et non encore tous élucidés. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de l'asthme allergique est nécessaire pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Il est établi que les nucléotides extracellulaires (ATP, ADP) jouent un rôle dans cette pathologie, à la fois chez l'homme et dans des modèles expérimentaux murins. Cependant, on ne connaît pas encore l'identité des récepteurs de ces nucléotides, ni les types de cellules qui expriment ces récepteurs et qui sont impliqués dans l'inflammation allergique. Parmi les récepteurs potentiellement impliqués dans la réponse aux nucléotides, le récepteur P2Y12 de l'ADP pourrait jouer un rôle central. En effet, ce récepteur est exprimé par les plaquettes sanguines, qui sont décrites comme étant potentiellement actrices de la réponse allergique. Il serait également potentiellement exprimé sur certaines populations de globules blancs, qui jouent un rôle clé dans ce type de pathologie. Nous souhaitons évaluer les contributions éventuelles du récepteur P2Y12 des plaquettes ou d'autres cellules circulantes dans l'asthme allergique.

La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle expérimental d'asthme allergique chez la souris afin de pouvoir réaliser des analyses d'échantillons (organes, sang, lavages broncho-alvéolaires.) suite à la réaction asthmatique. Ce modèle, largement accepté par

différents laboratoires spécialisés, repose sur une sensibilisation des souris à de l'ovalbumine de poulet couplé à un adjuvant, suivie deux semaines plus tard, à la réexposition des souris à ce même allergène par voie nasale. Ce protocole expérimental conduit à une réaction allergique, telle qu'elle est observée chez l'homme, avec une infiltration cellulaire dans les poumons ainsi qu'une production d'anticorps spécifiques de l'allergène.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le maximum de prélèvements seront réalisés sur les mêmes animaux (sang, organes).

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

-le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés

-les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études in vitro sur cellules (tests d'activation cellulaire).

Ce projet nécessitera 120 souris au maximum.

**8597** Notre projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux accidents cardio-vasculaires artériels et veineux chez les patients atteints de syndrome myéloprolifératif. Les syndromes myéloprolifératifs sont des maladies des cellules sanguines secondaires principalement à une mutation appelée Jak2V617F. Les accidents cardiovasculaires sont la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité chez ces malades ; 2/3 sont des accidents artériels et 1/3 veineux. Leur mécanisme est à ce jour incompris. Il a été montré chez les patients, par des marqueurs indirects, que la fonction vasculaire était altérée. Seule l'expérimentation in vivo, dans des modèles mimant le plus fidèlement possible cette pathologie permettra de comprendre les mécanismes complexes sous-jacents et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

La souris est le meilleur animal permettant d'étudier les complications cardiovasculaires secondaires aux syndromes myéloprolifératifs, car elle peut être génétiquement modifiée, pour porter la mutation Jak2V617F, comme chez les patients, et ainsi mimer la maladie humaine. Ainsi, ce modèle sera caractérisé dans un premier temps pour comparer le développement et les complications de la maladie. Ensuite, la fonction vasculaire sera analysée, in vivo et ex vivo après euthanasie de l'animal. L'effet de différentes thérapeutiques sera analysé, pour pouvoir ouvrir la voie à de nouveaux traitements chez les patients.

Les différentes procédures expérimentales ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs (Réduire). Les voies de signalisation impliquées seront dans un premier temps étudiées in vitro sur cellules en culture (remplacer) avant d'être confirmées in vivo chez la souris. Les greffes de moelle seront effectuées avec de la moelle de souris dont l'aorte est utilisée en parallèle pour analyse de la réactivité vasculaire (Raffiner).

Les procédures potentiellement douloureuses sont réalisées sous anesthésie pour que les animaux ne souffrent pas, des antalgiques seront donnés si nécessaire et des points limites ont été établis avec une euthanasie anticipée en cas de douleur avérée. Cette étude prévue sur 5 ans nécessitera au total 1445 souris (soit 289/an).

En conclusion, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les accidents cardio-vasculaires des patients atteints de syndromes myéloprolifératifs et d'évaluer l'efficacité de différentes thérapeutiques et ainsi diminuer la mortalité de ces patients.

**8598** L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les perturbations de la mémoire et de la sociabilité induites par la consommation de régime obésogène et si l'exercice peut améliorer les déficits observés chez les souris sous régime hyperlipidique. Notre équipe a en effet mis en évidence que la consommation de régime hyperlipidique pendant l'adolescence, en plus

d'entraîner un surpoids, perturbe les fonctions de diverses régions cérébrales dont l'hippocampe, une structure cérébrale indispensable au bon fonctionnement de la mémoire et des relations sociales.

L'objectif de ce projet est de pallier ces effets en exposant des souris à des roues d'activité soit pour prévenir la prise de poids et les perturbations mnésiques et sociales soit pour rétablir des niveaux normaux une fois les déficits observés. Par ailleurs, nous émettons l'hypothèse que l'exercice physique favoriserait les relations sociales en augmentant le taux d'ocytocine, peptide important pour la transmission des informations sociales.

Pour ce projet nous avons pris en compte les objectifs de remplacement, de réduction et de raffinement de la règle des 3R. En effet, la mémoire et les capacités sociales des souris seront évaluées par des tests comportementaux à l'échelle de l'organisme entier pour lesquels il est impossible de remplacer les animaux par des modèles *in vitro*. L'utilisation de rongeurs permet de procéder à des études fonctionnelles en déterminant les bases neurobiologiques de la mémoire et du comportement social. De plus, le nombre d'animaux a été calculé par rapport aux questions posées et au nombre optimal pour valider statistiquement les résultats quantitatifs obtenus avec 15 souris par groupe expérimental. Nous prévoyons d'utiliser 338 souris C57/Bl6 réparties selon leur régime nutritionnel (contrôle ou hyperlipidique), leurs conditions d'hébergement (igloo ou roue d'activité et isolées ou groupées) et la durée de ces conditions (exposition courte ou longue à une roue d'activité). Nous avons aussi choisi de multiplier les tests comportementaux par animal pour avoir une meilleure évaluation des fonctions cognitives et pour réduire le nombre d'animaux sans qu'il n'y ait d'interférences entre les différents tests.

Afin de contrôler leur prise alimentaire et leur activité physique (nombre de tours de roue), certaines souris des lots 1 à 4 seront isolées socialement pendant toute la durée du protocole (12 semaines). Cependant, les souris sont changées et manipulées pendant une minute de manière hebdomadaire et ont ainsi l'occasion de s'habituer à l'expérimentateur et peuvent interagir avec lui.

De plus, l'hébergement des souris est enrichi (présence d'un igloo ou d'une roue d'activité dans chaque cage) et elles sont observées tous les jours avec une attention particulière à leur comportement, notamment à l'utilisation de la roue comme jeu et de l'igloo comme refuge. Par ailleurs, si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal-être (poils hérissés/pelage abîmé, prostration, stéréotypies) ou une blessure, il sera immédiatement pesé, soigné et surveillé deux fois par jour jusqu'à ce que son état s'améliore ou il sera euthanasié au bout de 48h.

**8599** Les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la progression tumorale. Ces cellules immunitaires possèdent des récepteurs aux endocannabinoïdes (CB1R) qui pourraient intervenir dans leur fonction anti-cancéreuse. L'objectif de ce projet est d'évaluer le rôle de ces récepteurs exprimés par les cellules immunitaires dans le contrôle de la progression tumorale.

Ce projet s'appuie sur une procédure de transplantation de cellules cancéreuses murines B16F10 en sous cutanée chez les souris déficientes en récepteur CB1 (CB1R *-/-*) et les souris contrôles pour analyser la croissance tumorale, la production de certaines cellules immunitaires dans ce contexte tumoral et leur purification pour évaluation de leur potentiel anti-cancéreux. Un antagoniste récemment développé du récepteur CB1R sera comparé aux résultats obtenus avec les souris CB1R *-/-*.

Les modèles *in vitro* de lignées immortalisées des cellules immunitaires MDSC ne permettent pas d'évaluer leurs propriétés pro-tumorales et la différenciation *in vitro* de MDSC à partir de cellules de moelle osseuse ne correspond pas pleinement aux phénotypes retrouvés dans les modèles *in vivo* de cancer empêchant le remplacement du modèle souris par des modèles *in vitro*. L'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses murines permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale avec production de cellules immunitaires spécifiques et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées.

Pour répondre au volet raffinement, les souris soumises à la procédure expérimentale de transplantation de cellules cancéreuses seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. La transplantation des cellules cancéreuses chez les souris se fera sous anesthésie à l'isoflurane pour réduire la douleur. Les souris seront maintenues sans traitement

antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur euthanasie. Au total, 120 souris seront utilisées.

**8600** L'hippocampe est une structure cérébrale ayant un rôle clé dans les processus d'apprentissage et la mémoire. Au sein de cette structure, le gyrus denté présente la particularité d'être un site neurogénique permanent c'est-à-dire capable de générer de nouveaux neurones tout au long de la vie. Les neurones granulaires du gyrus denté sont en effet générés via trois vagues de neurogenèse : une première vague au cours de la vie embryonnaire, une seconde et la plus importante en période postnatale et une troisième à l'âge adulte. Ces neurones jouant un rôle clé dans les fonctions hippocampiques, il apparaît crucial de comprendre les mécanismes régulant leur développement et ceci en vue de prévenir ou traiter les troubles mnésiques. Nos recherches ces dernières années ont mis en évidence un rôle clé d'une catégorie de protéines, les protéines Rnd (Rnd1, Rnd2 et Rnd3), dans la régulation de la neurogenèse hippocampique à l'âge adulte. Ce projet vise maintenant à déterminer si ces protéines ont un rôle similaire ou différent dans la neurogenèse hippocampique développementale (embryonnaire et postnatale) et potentiellement de mettre en évidence des mécanismes de régulation différentielle entre les différentes phases neurogéniques.

Dans ce but, nous mettrons en place deux stratégies : une stratégie de perte de fonction (suppression du gène Rnd d'intérêt) et une stratégie de gain de fonction (surexpression de la protéine Rnd d'intérêt). La stratégie de perte de fonction sera menée sur des souris mutantes conditionnelles pour les Rnd (Rnd1flox/flox, Rnd2flox/flox, Rnd3flox/flox) alors que la stratégie de gain de fonction sera mise en place sur des souris de type sauvage de même fond génétique (C57BL6/J). Nous mettrons en œuvre des approches chirurgicales au stade embryonnaire (E14) et en période périnatale (P0) afin de supprimer ou surexprimer l'expression des Rnd dans les neurones granulaires générés à ces âges et nous étudierons ensuite les conséquences de cette suppression/surexpression sur les différentes étapes du développement neuronal, i.e. prolifération, survie, différenciation, migration, développement morphologique et intégration.

Pour ce projet, nous estimons utiliser 860 souris au total. Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 8 souris par groupe, ce qui permettra de faire des analyses statistiques cohérentes. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. N'existant pas de modèle in vitro permettant de reproduire l'environnement complexe caractéristique du gyrus dentelé, cette étude ne peut être réalisée que chez l'animal in vivo.

**8601** Les vaisseaux sanguins irriguent les tumeurs, apportent les nutriments nécessaires à leur croissance et permettent aux cellules tumorales de s'échapper pour former des métastases. De nombreuses stratégies anticancéreuses visent ces vaisseaux sanguins mais comme tout traitement utilisant une substance étrangère, elles présentent des effets secondaires. Dans la stratégie que nous avons développé avec nos partenaires nous utilisons des gouttes sensibles aux ultrasons. A l'aide d'une impulsion d'ultrasons, nous sommes en mesure de faire éclater ces gouttes sur une zone extrêmement restreinte avec pour conséquence une dégradation des membranes des cellules avoisinantes. Nous avons réalisé l'ensemble des expériences sur cellules nécessaire à la validation de la preuve de concept. Dans le présent projet, nous souhaitons transposer l'étude sur des animaux. Pour cela, nous souhaitons réaliser une cartographie par échographie haute résolution du réseau vasculaire de la tumeur avant et après explosion des gouttes par l'impulsion d'ultrasons au niveau de la tumeur. La stratégie d'explosion des gouttes a déjà été étudiée par notre groupe. L'originalité du projet consistera à suivre en direct par imagerie de haute résolution les perturbations engendrées sur la microvascularisation tumorales par la vaporisation de ces gouttes.

Les données recueillies lors de nos précédentes expériences sur la vaporisation des gouttes ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le



nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 3 à 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de pouvoir étudier la capacité de notre technologie à réaliser une cartographie haute résolution du réseau vasculaire de la tumeur chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro (remplacer). Ainsi, ce projet sera composé d'une seule procédure expérimentale qui nécessitera 30 souris.

**8602** Dans les régions intertropicales sévissent plusieurs maladies qui sont causées par des virus transmis par des moustiques, telles que la dengue ou le Zika. Ces infections sont responsables chaque année de centaines de milliers de cas cliniques et de complications neurologiques graves pouvant être mortelles. Les femelles moustiques doivent piquer un hôte vertébré (l'homme) pour absorber le sang nécessaire au développement de leurs œufs. A l'occasion d'un repas sanguin, le moustique peut s'infecter si l'hôte possède du virus dans son sang, puis transmettre le virus à un autre hôte en régurgitant le virus par sa salive lors d'un repas sanguin ultérieur. Beaucoup de questions restent encore sans réponse, en particulier les conditions précises dans lesquelles un moustique peut s'infecter sur un hôte porteur du virus.

Ce projet vise à déterminer, pour les deux virus cités, à quelle phase de l'infection de l'hôte un moustique se contamine le plus efficacement au cours du repas sanguin, et quels sont les paramètres d'infection associés à la transmission de l'hôte au vecteur. Nous voulons mesurer ces paramètres sur les deux espèces de moustiques responsables de la transmission de ces virus : *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Pour répondre à ces questions, il faut que les moustiques puissent recevoir un repas sanguin dans des conditions proches des conditions naturelles mais en contrôlant précisément le nombre de jours séparant l'infection de l'hôte du repas sanguin. Il faut également pouvoir récolter tous les moustiques qui ont piqué l'hôte pour déterminer s'ils ont été infectés ou non.

Pour ces différentes raisons, il est nécessaire que le moustique pique un hôte vertébré préalablement infecté. Le recours à un modèle animal est indispensable et permet de satisfaire toutes les conditions requises pour les objectifs du projet. La souris est l'espèce de choix car il est possible d'infecter par ces deux virus des souris déficientes pour la réponse interféron. L'infection par ces virus est bien décrite chez la souris. Nous testerons plusieurs paramètres d'infection pour étudier leur influence sur la transmission. Le nombre de souris utilisées pour chaque expérience a été optimisé pour le réduire tout en obtenant la puissance statistique souhaitée. Au total, ce projet utilisera 2130 souris dans une procédure de gravité légère et trois procédures de gravité modérée.

Chaque procédure expérimentale a été affinée pour réduire au maximum son impact sur le bien-être des animaux. Les souris seront anesthésiées avant d'être exposées aux moustiques dont les piqûres ne provoquent chez la souris ni inflammation, ni démangeaison. Le nombre de moustiques utilisés par repas sanguin a été ajusté pour le volume de sang qu'ils prélèveront soit compatible avec les recommandations en usage et n'induisent pas une anémie. Les souris seront mises à mort avant que surviennent les symptômes sévères de ces infections.

Ce projet fournira des données importantes autant pour la compréhension de la transmission de ces maladies à vecteurs que pour la modélisation épidémiologique de leur dissémination dans les régions d'endémie.

**8603** Ce projet a pour but d'étudier l'intérêt de l'ouverture de la barrière hémato-médullaire par un dispositif d'ultrasons non focalisés dans la maladie de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic sans qu'aucun traitement n'existe à ce jour.

La barrière hémato-médullaire est un filtre naturellement présent empêchant le passage des médicaments vers les neurones touchés par cette pathologie. Or, on sait qu'il est possible grâce à des ultrasons d'ouvrir pour 6 heures cette barrière.

Pour étudier cette maladie, nous utilisons des modèles de souris SLA afin de tester si l'ouverture transitoire permet de mieux faire passer des médicaments prometteurs. Nous étudierons également le bénéfice de cette ouverture sur le système immunitaire.

Dans ce projet, nous allons suivre différents groupes de souris, avec ou sans ultrasons, avec ou sans médicament. Nous espérons une augmentation de la survie des souris traitées par ultrasons. Ce projet nécessitera 40 souris saines et 80 souris modèle SLA donc, un nombre total de 120 souris pour une durée de 5 ans.

Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de réduction, remplacement et raffinement (3Rs). Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Cependant, dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées et avons, pour chaque procédure, défini un point limite. Un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

**8604** Les difficultés cognitives et le retrait social sont des symptômes invalidants dans le cas de la schizophrénie car les traitements actuels ont des effets limités sur ces symptômes. La recherche de traitement efficace pour ces symptômes représente ainsi un enjeu important.

Les récepteurs sigma du cerveau régulent diverses fonctions impliquées dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Ainsi les molécules agissant sur ces récepteurs représentent un espoir dans le traitement des maladies neuropsychiatriques comme la schizophrénie.

Dans ce projet, les symptômes cognitif et social observés chez les schizophrènes sont reproduits par l'utilisation de Phencyclidine chez la souris. Ce protocole est largement décrit dans la littérature et utilisé par la communauté scientifique comme modèle murin de la schizophrénie. Nous nous proposons donc d'utiliser ce modèle pour tester l'efficacité des molécules agissant sur les récepteurs sigma.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments in vitro, les réponses comportementales induites par ces nouveaux traitements sont des événements difficiles à simuler et à prédire par des expériences in vitro. De plus, ces expérimentations permettent de faire un lien avec une éventuelle application clinique. Ainsi, dans ce projet, l'utilisation d'animaux est incontournable avant une étude clinique.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables, nous utiliserons 15 animaux par condition expérimentale. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, le nombre de condition expérimentale sera optimisé au maximum par étude (jusqu'à 9 groupes expérimentaux) évitant ainsi la répétition des groupes de références (groupe avec des animaux normaux, groupe avec des animaux symptomatiques, groupe avec des animaux symptomatiques traités au composé de référence). Le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mise œuvre pour raffiner nos expériences, notamment une inclusion de phase d'acclimatation avant toute expérimentation, un enrichissement de l'environnement, une visite quotidienne, une gestion du stress et de la douleur suivant des échelles précises et des points limites bien établis.

Une utilisation de 5000 souris est prévue sur une période de 5 ans.

**8605** De nombreux cancers développent une résistance à la chimiothérapie causant le décès des patients. Ce phénomène est un vrai problème de santé publique. La majorité de ces cancers contient des cellules initiatrices de tumeur qui présentent une résistance aux agents chimiothérapeutiques et sont responsables de récurrences et métastases. Patched, le récepteur du morphogène Hedgehog, est surexprimé dans la majorité de ces cancers. Nous avons découvert que Patched possède une activité d'efflux de drogues et confère, aux cellules cancéreuses qui l'expriment, la capacité de résister à certains agents chimiothérapeutiques telle la doxorubicine. Cette étude a permis de proposer Patched

comme une nouvelle cible thérapeutique pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie sur les cancers surexprimant Patched (mélanome, sein, poumon, ovaires, colorectal, corticosurrénal).

Par la suite, le criblage in vitro de plusieurs banques de petites molécules nous a permis d'identifier deux molécules inhibitrices de l'activité d'efflux d'agents chimiothérapeutiques de Patched. Nous avons également montré que ces 2 molécules augmentent fortement l'efficacité de différentes chimiothérapies vis-à-vis de cellules cancéreuses in vitro.

Actuellement, l'objectif majeur de ce projet est de confirmer que ces 2 inhibiteurs de Patched offrent un bénéfice thérapeutique in vivo et donc de valider leur utilisation en combinaison de chimiothérapies dans un modèle pré-clinique.

Dans ce but, nous réaliserons un modèle de xéno greffe de mélanomes via transplantation par voie sous cutané de cellules tumorales humaines surexprimant Patched (Mewo et A375) chez des souris immunodéprimées (nudes). Dans le respect de la règle des 3R et donc par souci de raffinement, cette phase de greffe sera réalisée sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Après apparition des tumeurs, les souris seront réparties aléatoirement dans les différents groupes de traitements. Le volume tumoral sera alors mesuré au pied à coulisse pour évaluer la capacité de chacun des 2 inhibiteurs de l'activité d'efflux d'agents chimiothérapeutiques de Patched à inhiber la croissance tumorale de ce sous-type de cancer. Les résultats seront confirmés dans une seconde expérience ce qui implique que ce projet fera appel à 192 souris au total. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Ces études seront essentielles pour prouver l'efficacité thérapeutique de ces nouvelles molécules et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques des mélanomes.

**8606** Ce TP concerne des étudiants de première année après le BAC dans le cadre des enseignements de physiologie animale. Ces étudiants sont destinés à la profession de technicien et doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique ou dans des structures privées, par exemple dans le domaine de la pharmacologie. Ils peuvent donc être amenés, au cours de leur carrière, à travailler sur des animaux vivants. Les professionnels susceptibles de les recruter souhaitent que ces étudiants soient bien formés aux techniques utilisées en expérimentation animale. Au cours de ce TP, les étudiants étudieront grâce à un capteur non invasif la fréquence respiratoire et l'amplitude de l'inspiration et de l'expiration chez la souris anesthésiée et leur régulation après augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone dans l'air, après inhalation transitoire (inférieure à 10 secondes) d'un gaz inerte l'azote gazeux (diminution de la pression partielle en oxygène) et après injection intrapéritonéale d'adrénaline et de propranolol.

Dans ce cadre, ce TP a des objectifs pédagogiques et de formation relatifs à la biologie, la physiologie des grandes fonctions, la pharmacologie et l'expérimentation animale.

Réduction : les étudiants, répartis en trinôme ou quadrinôme, travailleront avec une souris par trinôme ou quadrinôme. Cette répartition permettra aux étudiants de surveiller l'animal aisément tout en réalisant les enregistrements / analyses des tracés de la respiration et les injections de molécules. Ce fonctionnement lors de ce TP permettra d'utiliser un nombre réduit d'animaux tout en garantissant l'apprentissage des étudiants.

Chaque année, 4 groupes de 14 étudiants au maximum réaliseront ce TP.

A chaque séance de TP un enseignant encadrera 1 groupe d'étudiants. Comme les gestes à réaliser sont relativement simples, leurs démonstrations seront réalisées lors d'un TD préalable au TP grâce à des photos et/ou vidéos et seront mimées lors du TP sur les animaux des étudiants, évitant ainsi l'utilisation d'un animal de démonstration.

Pour chaque groupe de 14 étudiants, 4 souris seront donc nécessaires. Soit un total de  $4 \times 4 = 16$  souris par an et 4 souris supplémentaires seront prévues par an afin de remplacer éventuellement une souris ne pouvant pas entrer dans le protocole pour cause de santé, soit 100 souris sur 5 ans.

Raffinement : les animaux seront hébergés en groupe de 5 à 8 animaux socialement harmonieux, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence de deux éléments d'enrichissement (tunnel ou cabane en polycarbonate ou en carton et du papier absorbant). Les

souris seront anesthésiées tout au long du TP. La profondeur de l'anesthésie sera évaluée avant de commencer la 1ère procédure mais également tout au long du TP, par les étudiants et l'enseignant. Tout signe de réflexe de l'animal induira l'administration immédiate d'une dose supplémentaire d'anesthésique. Pendant toute la durée du TP, les animaux seront placés sous une lampe afin d'éviter toute hypothermie. L'enregistrement des paramètres de respiration se fera grâce à un capteur de pression situé à la surface de la cage thoracique et maintenue en place grâce à une ceinture. Ce dispositif est donc non invasif. Enfin, le fait que les étudiants aient déjà vu les procédures en image ou en démonstration améliore leur travail sur les animaux et garantit une meilleure réussite des différentes procédures et donc de l'ensemble de ce TP.

Remplacement : dans le cadre de la formation de nos étudiants, le programme pédagogique prévoit, en physiologie et pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux. L'évaluation des étudiants sur ces pratiques sont inscrits dans le programme, que nous sommes tenus de respecter. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant la formation adéquate des étudiants.

**8607** Le cancer du sein est la deuxième cause de décès par cancer et est responsable de 15% de tous les décès par cancer chez la femme. Représentant 10 à 20% de tous les cancers du sein, les tumeurs basales mammaires (triple négatifs : pas de surexpression d'HER2 / récepteurs œstrogène et progestérone négatifs = TN) sont responsables d'une mortalité accrue en partie due à leur agressivité et au manque de thérapies ciblées pour les traiter.

Dans ce contexte, nous étudions un gène de la polarité : Lano. Des défauts de la polarité cellulaire peuvent avoir des conséquences sur l'embryogenèse mais aussi être à l'origine de cancers. Lano est un gène spécifique des vertébrés dont l'implication d'une expression amplifiée dans les hépatocarcinomes cellulaires a été rapportée. L'objectif de ce projet est donc d'étendre l'étude de son rôle dans les tumeurs mammaires basales et celles amplifiées pour HER2 par des approches combinées in silico, in vitro, et in vivo.

Nous avons établi in silico des courbes de survie sans métastases à partir de l'expression de Lano chez des patientes atteintes de différents cancers mammaires. La diminution de l'expression de Lano est de bon pronostic dans les cancers TN alors que sa surexpression est de mauvais pronostic. Conformément à des objectifs de remplacement et de réduction, nous avons vérifié ces données in vitro à l'aide de lignées cellulaires de cancer humains TN basales (SUM149 et HCC1806) et mésenchymales (MDA-MB231 et SKBR7) modifiées génétiquement pour qu'elles n'expriment plus ou surexpriment Lano et avons démontré des conséquences sur leurs propriétés migratoires, prolifératives et sur leur activité de cellules initiatrices de la tumeur (cellules souches).

Nous souhaitons à présent évaluer in vivo l'impact de l'extinction de l'expression de Lano sur l'établissement la progression de tumeurs TN afin de tenter de confirmer le fait que Lano pourrait être considéré comme une nouvelle cible thérapeutique. Dans ce but, nous projetons de réaliser de manière séquentielle deux séries d'études complémentaires pour déterminer l'action de Lano sur la pousse tumorale :

Dans une première étape, nous planifions de greffer de manière orthotopique les différentes lignées cellulaires déjà utilisées in vitro ainsi que les contrôles appropriés dans des souris immunodéficientes afin d'observer d'une part, si leur pouvoir carcinogène et/ou métastatique est modifié in vivo, et d'autre part si leur activité de cellules souches est altérée. Si et seulement si, les résultats de ces études permettent de conclure à un rôle de Lano dans ces modèles, nous procéderons alors à la transplantation de cellules issues d'échantillons cliniques sélectionnés.

Lors de cette seconde étape, nous transplanterons aux souris directement des échantillons de patientes. Ces modèles sont plus proches de la physio-pathologie et ont déjà été caractérisés, au cours d'un précédent projet, pour leur progression chez la souris. Ces échantillons seront, comme précédemment, modifiés de manière à supprimer l'expression de Lano avant de les xéngreffer afin d'analyser l'impact de la perte de ce gène dans la progression tumorale dans des conditions plus proches des patientes. au cours de ces 2 étapes et dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement de la pathologie se fera par des mesures cinétiques utilisant l'imagerie optique in vivo par bioluminescence (non invasive) sous anesthésie gazeuse (Vetflurane). Cette technologie très sensible permettra également de détecter d'éventuelles métastases et donc

d'évaluer le rôle de Lano sur ce processus. De même, l'ensemble des procédures de transplantation sera réalisé sous anesthésie (xylazine+kétamine) associée à une analgésie (meloxicam) pré et post-opératoire afin d'éviter toute douleur. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux au cours des procédures nécessaires à la réalisation de nos objectifs, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Toujours dans le souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe sera basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 90% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Au total, un maximum de 374 souris est prévu pour la globalité de l'étude

**8608** Dans un contexte où différentes transitions alimentaires touchent ou vont toucher les populations des pays émergents et développés, promouvoir une alimentation saine et durable constitue un objectif primordial pour assurer à la fois la santé publique et un développement agro-alimentaire durable. Ces transitions nutritionnelles recouvrent des changements de l'apport glucido-lipidique qu'on sait impliqués dans les dérégulations métaboliques associées au risque cardiométabolique, et impliquent des changements des teneurs et sources de protéines animales et végétales dont on connaît mal les répercussions métaboliques. Par rapport aux protéines animales, les protéines végétales sont considérées comme de moindre qualité en termes de satisfaction des besoins protéiques, du fait de leurs plus faibles digestibilités et de leurs moindres teneurs en acides aminés indispensables. Néanmoins, on méconnaît les réorientations métaboliques qui seront induites par l'augmentation attendue de la part des PV dans l'alimentation, et qui pourraient se révéler favorable en termes de prévention des dérivés cardiométaboliques.

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

Le projet prévoit donc la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat (n=48) afin de caractériser les effets d'une alimentation à base de protéines végétales sur le métabolisme et le risque cardiométabolique dans le contexte d'une alimentation de type occidentale. Les animaux seront nourris avec des régimes normolipidiques ou hyperlipidiques combinés soit à une source protéique 100% animale soit 100% végétale. Ce projet, de nutrition et physiologie intégrative (interactions entre tissus et organes pour l'utilisation des différentes sources protéiques) ne peut être réalisé que sur des organismes intègres et in vivo. Aucune méthode in vitro ne permet de mettre ainsi en évidence et de quantifier les échanges de nutriments entre tissus et organes dans un contexte de risque cardiométabolique.

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

**8609** On dénombre environ 6 000 maladies génétiques dans le monde. Leurs causes sont aussi diverses que les symptômes qui en découlent.

Leur point commun : elles sont toutes causées par une anomalie au niveau d'un gène ou d'un chromosome. Les maladies génétiques ont la particularité de pouvoir concerner non seulement la personne atteinte mais aussi sa famille.

Cette anomalie entraîne un défaut de fonctionnement de certaines cellules de l'organisme. L'activité et la structure de chaque protéine est déterminée par l'information génétique contenue dans un gène. Si le gène est altéré, il entraîne dans la cellule un dysfonctionnement, qui peut se révéler, à tout âge de la vie, par l'expression d'une maladie.

Ici, nous avons pour objectif d'étudier et développer une nouvelle approche innovante, la combinaison de CRISPR/Cas9 (= ciseau à ADN : technique de suppression et d'insertion de gènes sur des sites spécifiques) et d'un vecteur de transport innovant. Ce système de thérapie génique, s'il fonctionne efficacement, pourrait à terme être transféré chez l'Homme pour soigner des maladies génétiques.

Notre but sera d'utiliser le système "ciseau à ADN" pour réparer des mutations génétiques héréditaires et corriger localement le phénotype via différentes voies d'injections. Ce système facilitera la suppression de la partie malade du gène en question et permettra ainsi de corriger des mutations connues.

Pour cela, nous allons tester 4 types de vecteurs différents et 5 voies d'administration différentes sur une lignée de souris reportrice connue afin d'évaluer les meilleures conditions expérimentales et la meilleure biodistribution.

Remplacement : Cette approche a pour objectif d'évaluer un protocole de thérapie génique pour traiter certaines maladies génétiques en diminuant le risque d'effets secondaires par l'utilisation de vecteurs spécifiques; ce qui nécessite l'utilisation d'expériences in vivo et ne peut donc pas être remplacée par des expériences in vitro.

Réduction : L'effectif des animaux est réduit au maximum. Un test statistique adapté sera utilisé pour l'analyse des résultats et tenant compte des risques de mortalité. 170 animaux seront nécessaires à l'étude.

Raffinement : Afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures potentiellement stressantes ou douloureuses seront réalisées sous anesthésie générale. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs. Bien qu'aucune souffrance particulière ne soit attendue au cours de ce projet.

Dans ce projet, notre objectif est de trouver les meilleures conditions d'administration pour dans un deuxième temps développer une approche innovante pour l'étude de maladies génétiques humaines et trouver à terme des pistes de soin chez l'Homme.

**8610** La fièvre jaune (FJ) ou "Yellow Fever" en anglais est une infection virale aiguë qui demeure toujours une cause importante de maladies hémorragiques dans plusieurs pays africains et sud-américains, pouvant causer la mort des individus touchés.

D'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2007, 206 000 cas de fièvre jaune ont été recensés dans douze pays africains (Bénin, Burkina Faso, Cameroun, Côte d'Ivoire, Ghana, Guinée, Libéria, Mali, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone et Togo), provoquant 52 000 décès. L'OMS a estimé alors que l'épidémie pourrait faire entre 1,5 et 2,7 millions de morts, si aucune action n'était menée en matière de prévention vaccinale.

Le moyen le plus efficace de se prémunir de la FJ est la vaccination. Un vaccin efficace vivant issu d'une souche virale atténuée par passage sur embryon de poulet existe, mais de manière exceptionnelle (moins d'un cas pour cent mille vaccinations) survient un effet « viscerotrope » avec des symptômes proches de ceux d'une FJ et pouvant aboutir au décès dans environ la moitié des cas.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser un modèle infectieux chez le hamster du virus de la FJ dans le but d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits vaccinaux, sans effets secondaires.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

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 l'efficacité d'un vaccin dans un organisme entier vivant.

L'espèce hamster a été choisie car c'est un modèle classiquement utilisé dans les études sur la FJ. Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de détecter l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place.

Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou euthanasie des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles solutions thérapeutiques contre la FJ.

**8611** La pression d'oxygène joue un rôle clé dans le contrôle de la maintenance et la prolifération des cellules souches. Ainsi, au niveau du cerveau, la pression faible en oxygène (condition physiologique) permet de maintenir les cellules souches et progéniteurs neuraux à un stade où ils ne sont pas différenciés. Un des éléments clés de l'adaptation des cellules aux variations de pression d'oxygène repose sur l'expression de facteurs de transcriptions dits facteurs inductibles à l'hypoxie (famille des Hif). Parmi ces facteurs, Hif1a représente celui dont la caractérisation et les mécanismes d'action ont été les plus largement étudiés. Il a clairement été démontré que Hif1a régule de nombreux gènes cibles impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie notamment dans les processus d'angiogenèse, d'érythropoïèse, de glycolyse et de survie cellulaire. Plusieurs études ont par ailleurs établies que Hif1a est essentiel pour le développement précoce de nombreux organes y compris celui du cerveau. La délétion systémique de Hif1a chez la souris conduit irrémédiablement à une mort embryonnaire précoce au stade 11 jours de gestation principalement accompagnée de malformations cardiaques et vasculaires importantes. Même si des études ont montré que Hif1a est exprimé dans le cerveau et qu'il est nécessaire aux phénomènes angiogéniques et de neuroprotection du cerveau lors de pathologies, la contribution de Hif1a au développement du cerveau embryonnaire et adulte en condition normale n'est pas encore clairement établie. Son implication précise est encore moins connue dans la neurogenèse, dans la formation des cellules du système nerveux à partir des cellules souches neurales (CSN), ainsi que dans la réponse cellulaire pouvant faire suite à une irradiation accidentelle ou médicale pouvant intervenir chez la femme enceinte.

Nous souhaitons étudier les conséquences d'un déficit de Hif1a dans les cellules souches neurales et leur environnement au cours de la neurogenèse embryonnaire et adulte. Parallèlement, nous étudierons l'impact de sa déficience dans la réponse à l'irradiation des cellules souches neurales (migration, différenciation et mort cellulaire). Pour ce faire, nous nous proposons de développer un modèle transgénique déficient pour Hif1a. Ce modèle animal devrait améliorer les connaissances scientifiques dans l'implication de Hif1a dans la migration radio-induite des cellules souches neurales et dans l'identification de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la réponse à l'irradiation des cellules souches neurales.

Aucune méthode alternative n'existe à ce jour qui pourrait modéliser la complexité du cerveau et l'ensemble des processus physiologiques ayant lieu au cours du développement embryonnaire du cerveau. Il est en de même pour le cerveau adulte.

Le modèle rongeur a été retenu car la neurogenèse chez le rongeur présente de nombreuses similitudes avec celles de l'ensemble des mammifères. Ce modèle nous permet également d'obtenir rapidement les différents génotypes nécessaires à l'étude.

Les protocoles mis en jeu ici requièrent la création de deux lignées transgéniques murines dans lequel Hif1a est inactivé, partiellement ou totalement, spécifiquement au niveau des CSN. Une lignée témoin exprimant normalement Hif1a sera également nécessaire. La neurogenèse de ces lignées murines sera étudiée en condition normale de développement ou après irradiation. Les conséquences de la suppression de Hif1a seront suivies par la mise en place de protocoles utilisés en routine au laboratoire comprenant des analyses immunohistochimiques sur coupes de cerveaux et des techniques d'isolation des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux.

Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude qui durera cinq ans (900 souris adultes (450 femelles gestantes et 450 souris adultes) et 2700 embryons a été déterminé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables permettant de ne pas compromettre la validité des expériences.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu des souris est également enrichi à l'aide de coton de nidification et de tube en carton. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

**8612** La rétine, le tissu nerveux tapissant le fond de l'œil, a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse des photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite

transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de phototransduction. Ce mécanisme se déroule au niveau des photorécepteurs rétiniens (les bâtonnets, très sensibles à la lumière et responsables de la vision nocturne et les cônes, responsables de la vision diurne et chromatique).

La perte progressive des photorécepteurs dans les maladies rétiniennes héréditaires, telles que les Rétinites Pigmentaires (RPs), est une des causes fréquentes de déficience visuelle avec une prévalence de 1/4 000, ce qui représente environ 17 000 patients en France. Plus de 50 mutations ont été identifiées dans le gène CRX humain et celles-ci sont associées à une amaurose congénitale de Leber autosomique dominante (ACL), à des dystrophies des cônes (CORD) et à des RPs. La dystrophie cônes/bâtonnets (CORD), qui nous intéresse plus particulièrement au sein du projet présenté ici, est caractérisée dans un premier temps par une perte des cônes situés majoritairement dans la macula puis celle des bâtonnets. Il en résulte tout d'abord une perte de la vision centrale suivie d'une perte de la vision périphérique. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour cette pathologie.

L'objectif global de notre équipe est de restaurer la fonction visuelle dans les modèles de souris de rétinopathies associées à CRX en fournissant une copie saine de CRX (CRXWT) à l'aide de vecteurs de thérapie génique type vecteurs dérivés du virus adéno-associés (AAV) pour outrepasser l'effet dominant qui a pu être démontré pour de nombreuses formes mutées de CRX. Cette stratégie semble être une approche thérapeutique intéressante. En effet, de nombreux travaux ont montré que certains vecteurs AAV étaient capables de transduire de manière très efficace plusieurs types cellulaires du tissu rétinien et d'induire une expression stable du gène d'intérêt sur le long-terme chez la souris, le rat, le chien et le primate à la suite d'une injection intraoculaire.

Dans le but de développer un essai clinique chez les patients, nous souhaitons évaluer la toxicité et la biodistribution du vecteur VAR-CRX02 injecté en dose unique en sous-rétinien chez le macaque fascicularis au cours d'une période de suivi post-injection de 24 semaines. En effet, la taille et l'anatomie de l'œil du macaque étant proches de celles de l'homme, il est ainsi possible de mieux évaluer les effets du transfert du gène d'intérêt dans ce modèle. Ceci est de première importance pour évaluer les effets toxiques potentiels de la surexpression d'un facteur de transcription dans les photorécepteurs. Au cours de ce projet, une injection sous rétinienne unilatérale sera réalisée avec le vecteur VAR-CRX02 chez 3 macaques, l'autre œil étant non injecté et servant de contrôle. Les animaux seront suivis durant 24 semaines post-injection pendant lesquelles seront évalués l'aspect structural de la rétine par FO/OCT (Fond d'œil, Tomographie à cohérence optique), ainsi que l'activité électrique de celle-ci par ERG (Electrorétinographie). Après euthanasie, les rétines seront analysées afin d'évaluer l'expression du transgène.

#### 1-Réduction

La constitution du groupe expérimental, à savoir 3 animaux/groupe, est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure.

#### 2- Raffinement

Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale par injection sous-rétinienne se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux) et protocole analgésique approprié (anti-inflammatoires non stéroïdiens). Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude, seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min). Les examens ophtalmologiques (électrorétinographie, fonds d'œil...) seront réalisés sous anesthésie générale également (anesthésie fixe avec relai gazeux). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces différentes procédures. Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 quand cela est possible (hors période de suivi post opératoire par exemple).

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre de thérapie génique. Ce Centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films,



mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat (avec notamment hébergement en volières dès que cela est possible).

### 3-Remplacement

Cette étude aura lieu chez le macaque fascicularis. En effet, une telle étude ne peut être réalisée chez le rongeur, des différences nettes inter-espèces ayant été mises en évidence en ce qui concerne la transduction avec les vecteurs AAV. Les études chez le primate non humain apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité et de toxicité de l'AAV, ce qui permet d'extrapoler les résultats à l'homme, ce qui est indispensable dans notre contexte de volonté de développement d'un essai clinique à cours terme. Ceci ne peut être obtenu in vitro et justifie ici notre recours à des animaux.

**8613** Ce protocole d'étude vise à étudier le rôle d'une lectin-like de type C, CLEC-1 dans l'immuno-régulation et notamment dans la réponse immune anti-tumorale. En effet, la recherche de nouvelles molécules impliquées dans les processus de tolérance en transplantation, a permise l'identification de la molécule CLEC-1 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. L'étude des mécanismes associés à la tolérance représente des enjeux médicaux et économiques cruciaux. Nous avons préalablement montré chez le rat et l'Homme que CLEC-1 présente des propriétés immuno-régulatrices dans les cellules dendritiques. En effet, CLEC-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler la réponse effectrice des LT CD4+ notamment les Th17 et Th1. Ces résultats suggèrent que CLEC-1 pourrait agir comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en inhibant la réponse T effectrice et la polarisation Th17 et Th1. Ceci est d'un enjeu crucial car les réponses Th17 et Th1 sont impliquées dans le rejet de greffe mais aussi dans les maladies auto-immunes et de nombreuses maladies inflammatoires. Au contraire, bloquer CLEC-1 permettrait d'amplifier une réponse Th1 et Th17 et une meilleure réponse anti-tumorale. La molécule CLEC-1 pourrait donc servir d'outil thérapeutique pour inhiber ou augmenter cette réponse Th17 et Th1. Il s'avère donc important d'étudier de façon plus approfondie la fonction de cette molécule dans des modèles in vivo chez le rongeur. C'est pourquoi nous proposons ici d'étudier le rôle de CLEC-1 dans la réponse anti-tumorale in vivo par l'utilisation de souris déficientes (CLEC-1 KO) pour cette molécule.

En effet, une meilleure compréhension de la régulation et des actions du CLEC-1 dans un modèle préclinique in vivo chez le rongeur dans des modèles de cancérologie est un préalable nécessaire avant d'envisager une transposition chez l'homme. Il est nécessaire d'étudier chez le rongeur ce que fait l'absence de CLEC-1 dans la réponse anti-tumorale via des KO pour envisager de développer des outils thérapeutiques pour bloquer CLEC-1 chez l'Homme. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un modèle animal ressemblant à ce qui se passe chez l'Homme dans le développement tumoral pour tester l'implication d'une molécule. Il est également nécessaire d'avoir accès aux organes lymphoïdes secondaires et à la tumeur pour étudier les mécanismes liés à la déficience de cette molécule CLEC-1 dans la réponse antitumorale; et non de se limiter au sang comme chez l'Homme. Notre modèle d'étude sera donc des souris (au nombre de 160 au total) déficientes (KO) en CLEC-1 (80 souris) ou Wild type (80 souris) chez lesquels nous projetons d'implanter des cellules tumorales et d'observer leur croissance.

Nous respecterons strictement la règle des 3R, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés par groupe étudié. Les animaux seront hébergés dans l'animalerie selon les normes qui leur sont propres afin de ne pas ajouter un stress supplémentaire au protocole utilisé. Les animaux seront suivis tous les jours, afin de détecter le plus précocement une douleur et d'y mettre un terme, soit par traitement antalgique, soit par euthanasie de l'animal notamment si la taille de la tumeur devient trop importante et si la souffrance ne peut pas être contrôlée et ce afin de ne pas biaiser les résultats.

**8614** Nos projets visent à étudier l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux dans des cancers du rein qui présentent soit une insensibilité soit ayant acquis des résistances aux thérapies classiques dans le cancer du rein. Le cancer du rein a comme principale caractéristique d'être incurable et fortement métastatique. En plus d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements, nous tâcherons de déterminer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements.

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 autorisation de mise sur le marché (AMM). Notre but est également de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour répondre aux besoins des patients atteints de cancer du rein. Pour ce faire, nous réaliserons une étude chez la souris.

Notre étude a pour but de confirmer que l'inhibition d'une protéine (PLK1) par un agent pharmacologique, le volasertib, induit une régression tumorale, et ceci afin de pouvoir à terme proposer cette alternative de traitement aux patients atteints de cancer du rein résistants au traitement de référence, le sunitinib, un traitement inhibant la vascularisation tumorale.

Afin de respecter la règle des 3R, ces expériences sur les animaux ont été précédées d'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 tumorales mais aussi suite à l'administration des différents traitements. 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 dument 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 non contournables. Nous utiliserons pour ce projet un total maximum de 120 souris. 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.

**8615** L'infarctus du myocarde est la première cause de mortalité cardiovasculaire. En France, l'incidence de l'infarctus du myocarde est d'environ 120.000 nouveaux cas par an. Son apparition est liée à la formation de plaques d'athérome obstruant progressivement les artères coronaires du cœur. La prise en charge de cette affection repose sur la restauration en urgence d'un flux coronaire par la technique de revascularisation : l'angioplastie. Cependant, cette reperfusion réduit seulement l'étendue de l'infarctus. Elle ne permet pas d'agir sur les désordres cellulaires et métaboliques qui sont responsables des effets délétères lors de la reperfusion. De nouvelles approches expérimentales sont proposées dans le but d'agir à la reperfusion myocardique, en complément des procédures de revascularisation. Une molécule a été développée pour cibler spécifiquement les acteurs de la mort cellulaire libérés à la reperfusion myocardique.

Dans ce projet, nous proposons d'évaluer l'effet cardioprotecteur d'une molécule anti-apoptotique au décours d'une ischémie-reperfusion myocardique chez le lapin. Cette molécule, validée récemment dans un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris, a révélé une réduction de la taille d'infarctus et des mécanismes de mort cellulaire. En vue d'une translation vers la clinique, il est nécessaire de faire la preuve-de concept de l'utilisation de cette molécule dans un modèle d'ischémie-reperfusion non rongeur chez le lapin.

L'étude expérimentale de modèles animaux est primordiale en pharmacologie, afin d'établir des preuves de concept de l'efficacité et de l'innocuité avant de conduire un essai clinique chez l'homme. La démonstration de l'efficacité d'une telle molécule potentiellement utilisable chez l'Homme ne peut être validée que sur l'animal (Remplacement). Afin d'étudier l'effet de cette nouvelle molécule, nous utiliserons 12 lapins qui seront anesthésiés profondément pour être soumis à la procédure. Ce nombre d'animaux permettra de mettre en évidence un éventuel effet réducteur de la taille d'infarctus, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux.

**8616** Le cortex cérébral ou néocortex est impliqué dans des fonctions cognitives comme la perception sensorielle, la motricité volontaire et le langage. Comprendre les interactions entre neurones et cellules oligodendrogiales ainsi que la dynamique de ces dernières dans le néocortex normal et malade est la clef pour répondre à des questions sur la plasticité neuronale et la myélinisation. De

plus, le dysfonctionnement de ces interactions cellulaires peut entraîner des maladies mentales graves. Dans ce projet, nous étudierons ces interactions ainsi que la dynamique de recrutement, de la prolifération et de la différenciation des cellules oligodendrogiales au niveau du néocortex de la souris en conditions normales et pathologiques. Nous éluciderons les mécanismes dépendants de l'activité neuronale qui contrôlent l'oligodendrogenèse.

Nos expériences seront menées au cours du développement embryonnaire et postnatal du cortex en utilisant une chirurgie stéréotaxique et plusieurs types de protocoles expérimentaux. Ces protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures in vitro car il s'agit de reproduire l'environnement naturel des cellules et d'étudier leur dynamique. Un total de 1268 souris transgéniques sur cinq années sera utilisé pour des stimulations optogénétiques, des expériences d'imagerie biphotonique et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Cette étude est importante pour comprendre la dynamique des cellules oligodendrogiales chez l'animal vivant au cours du développement normal et anormal du cortex. Cette étude est importante car cette région est impliquée dans de nombreux troubles psychiatriques et mentales. Nous espérons que les résultats de notre projet ouvrent donc la voie pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies.

**8617** Les maladies chroniques du foie sont fréquentes. Ainsi, on estime qu'il y a en France environ 700'000 malades atteints de cirrhose. La stéatohépatite non alcoolique (ou NASH) est une des principales causes de maladies chroniques du foie. Elle est définie par l'accumulation excessive de lipides dans le foie (stéatose), d'une mort excessive des cellules du foie (les hépatocytes), d'une inflammation hépatique avec ou sans fibrose. Elle correspond à la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Aucun agent thérapeutique efficace n'est actuellement disponible pour la NASH. Plus généralement, les mécanismes responsables de la progression des maladies du foie vers la cirrhose, et des complications de ces maladies, restent incomplètement compris.

Les cellules endothéliales hépatiques sont les cellules qui bordent la face interne des vaisseaux sanguins du foie. Ce sont donc les premières cellules en contact avec le sang qui irrigue le foie. Bien que leur rôle soit mal élucidé, elles semblent importantes dans des processus clé que sont la progression de la fibrose et le développement du carcinome hépatocellulaire.

L'autophagie est un processus cellulaire par lequel du matériel cytoplasmique dysfonctionnel est dégradé et recyclé. Le rôle de l'autophagie dans les cellules endothéliales est mal connu.

Des résultats préliminaires que nous avons obtenus sur des biopsies hépatiques humaines suggèrent qu'il existe dans le foie des malades atteints de NASH un défaut d'autophagie dans les cellules endothéliales hépatiques.

Objectif du projet : déterminer le rôle de l'endothélium hépatique dans les maladies chroniques du foie telles que la NASH et la cirrhose. Une attention particulière sera portée au rôle de l'autophagie endothéliale.

Avantages escomptés :

Il n'existe pas de modèle in vitro reproduisant de manière fiable la NASH ou la cirrhose. L'utilisation de modèles animaux est donc essentielle. C'est vers des modèles de souris que se porte notre choix car des souris transgéniques existent permettant de déléter spécifiquement dans l'endothélium des voies de signalisation et en particulier l'autophagie. Les souris seront soumises à des régimes alimentaires spécifiques (régime gras ou régime déficient en méthionine et en choline) afin d'induire une NASH ce qui nous permettra d'évaluer l'effet le rôle de l'endothélium dans le développement de cette maladie. Des souris seront également traitées au tétrachlorure de carbone afin d'évaluer le rôle des cellules endothéliales dans le développement de la fibrose hépatique

Nous évaluerons également le potentiel thérapeutique de l'autophagie endothéliale en stimulant ce processus chez des souris atteintes de maladie du foie. Ceci nous permettra donc d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies.

Des expériences in vitro sur cellules en cultures seront effectuées avant les expériences animales pour seulement valider chez l'animal ce qui aura été identifié in vitro. Ceci permettra donc de réduire le nombre d'animaux qui sera utilisé.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet a été calculé de manière à utiliser le minimum de souris tout en assurant des résultats robustes scientifiquement et statistiquement. Les souris de type sauvage qui constitueront les groupes contrôles seront utilisées dans différents protocoles.

Tous les animaux qui seront utilisés dans ce projet seront surveillés quotidiennement et toutes les mesures nécessaires à leur bien-être seront prises. De même, toutes les mesures en vue de réduire la souffrance, le stress ou l'anxiété seront prises si un animal présente un de ces signes. L'atteinte d'un point limite pourra entraîner dans certains cas l'euthanasie de l'animal si nécessaire.

Ce projet se déroulera sur cinq ans et nécessitera 990 souris. A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre la physiopathologie des maladies du foie et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies qui souffrent du manque d'agents thérapeutiques efficaces.

**8618** Ce projet a pour but de créer des lignées de souris génétiquement modifiées, de cryoconserver des lignées, ainsi que de redériver (décontaminer) des lignées de souris à partir d'embryons frais ou congelés pour la recherche scientifique.

La création de lignées permet d'obtenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale ainsi que des modèles de pathologies humaines pour la recherche médicale. La décontamination des lignées par transfert d'embryons permet l'obtention d'animaux indemnes d'agents pathogènes et de certains opportunistes. La cryoconservation permet la sauvegarde de lignées rares et précieuses, la simplification des échanges d'animaux entre chercheurs et la diminution du stress des animaux lors du transport.

Ces différentes techniques nécessitent l'utilisation de très jeunes embryons (<4 jours), obtenus par accouplements des mâles d'intérêts avec des femelles, après super ovulation, c'est-à-dire après injection d'hormones pour déclencher l'ovulation.

Ces embryons sont ensuite réimplantés chirurgicalement chez une mère-porteuse, préalablement accouplée avec un mâle stérile, ce qui stimule hormonalement la femelle afin qu'il y ait une bonne maturation de l'endomètre (épaississement + irrigation) pour que les embryons trouvent une muqueuse utérine propice à leur développement.

La majorité des animaux générés sont hétérozygotes pour la modification génétique induite et ne présentent pas de phénotype dommageable. Toutefois si un tel phénotype apparaissait, un suivi particulier et adapté serait alors mis en place avec évaluation à l'aide d'une grille de scoring.

Ce projet ne peut être réalisé que chez la souris, aucun remplacement par une technique alternative n'est possible.

Les animaux ont tous une période d'acclimatation et leur milieu de vie est contrôlé. Toutes les cages sont enrichies de coton compacté qui permet de créer des nids. Lors des chirurgies, les animaux reçoivent une anesthésie et une analgésie adéquates pour éviter toute douleur et sont surveillés quotidiennement.

Des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

L'amélioration constante des techniques est une préoccupation permanente afin de répondre aux exigences de raffinement et de réduction.

Pour l'ensemble des lignées produites, redérivées ou archivées, les besoins pour la recherche sont estimés à 8600 souris par an, soit 43000 animaux pour les 5 ans du projet. Ce nombre est un maximum, il est susceptible d'être diminué en fonction des demandes. De plus, la cryoconservation permet la réduction du nombre d'animaux élevés mais non utilisés.

L'élevage de souris génétiquement modifiées, spécialement conçues pour la recherche médicale, est une nécessité afin de pouvoir étudier les maladies génétiques mais également beaucoup d'autres pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurologiques, et développer de nouveaux traitements.

**8619** Le lithium est un métal alcalin très léger. A ce jour aucune voie métabolique ou processus biochimique n'a été décrit comme nécessitant la présence de lithium, suggérant qu'il n'a aucun rôle biologique et n'est pas nécessaire aux organismes vivants. Il est cependant utilisé en médecine humaine depuis le milieu du 19<sup>e</sup> siècle. Il est recommandé aux patients atteints de troubles bipolaires. Ces personnes présentent une alternance de phases dépressive et d'excitation euphorique (accès maniaques). Durant celles-ci les patients sont très actifs, débordent d'énergie et de projets. L'administration de sels de lithium prévient la survenue des phases dépressives et maniaques. L'arrêt du traitement provoque leur réapparition. Ainsi, certaines personnes suivent le traitement pendant des années, voire des décennies. Or, un traitement chronique à base de sels de lithium s'accompagne d'effets indésirables notamment des troubles neurologiques. La littérature rapporte l'existence par exemple de tremblements, voire un parkinsonisme ou des troubles de la mémoire. Il semble que ceux-ci soient liés à une accumulation du métal dans le système nerveux central. Cependant, on connaît encore très mal les sites d'accumulation du lithium dans le cerveau.

Ce projet vise à déterminer les sites d'accumulation intracérébrale du lithium en réalisant une cartographie 3D du lithium dans le cerveau. Cette question a déjà été abordée par imagerie IRM. Or cette technique ne permet pas de faire une mesure élémentaire directe, ni d'obtenir une résolution spatiale cellulaire. Nous envisageons d'analyser la distribution du lithium par la technique du LIBS (laser-induced breakdown spectroscopy) car elle présente de nombreux avantages par rapport à l'IRM : meilleure sensibilité, meilleure résolution spatiale et, tout aussi important, elle permet de détecter simultanément plusieurs éléments donc de poser la question de l'impact du lithium sur les éléments chimiques endogènes (magnésium, cuivre, fer, zinc,...). Le LIBS réalise une ablation par impulsion laser d'une faible quantité de matière, qui se retrouve sous la forme d'un  $\mu$ -plasma et qui émet alors des signaux élémentaires spécifiques détectables par spectroscopie optique.

Cette étude de la distribution intracérébrale du lithium ne peut être abordée sur des cellules maintenues en culture. Pour déterminer les zones d'accumulation du lithium dans l'organe entier il est nécessaire de recourir au modèle animal car il faut maintenir l'intégrité et la structure de l'organe. Ceci permet de s'approcher au mieux de la clinique humaine où le médicament passe dans le sang avant d'atteindre le cerveau.

Les animaux choisis pour ce projet sont des rongeurs nés et élevés en France. Ils sont hébergés dans une animalerie agréée, dont l'environnement est enrichi en module permettant aux animaux de varier leurs activités, sous la surveillance journalière de personnels qualifiés et expérimentés. Le nombre d'animaux requis (40) pour ce projet de 2 années est réduit au minimum nécessaire pour que les résultats soient statistiquement interprétables.

**8620** La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, cette pathologie sera la pathologie la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après les études multicentriques, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

Des travaux récents ont indiqué un effet antidépresseur de la kétamine dans divers modèles, mais ces résultats sont peu reproductibles, car ils varient en fonction du test, du modèle expérimental, de la dose ou du délai post-administration utilisés. Nous souhaitons rendre ces résultats plus systématiques, dans le but de définir les meilleures conditions pour observer ces effets. Cela nous permettra par la suite d'étudier les mécanismes sous-jacents.

Dans un premier temps, nous évaluerons la dose de Kétamine nécessaire pour avoir un effet dans trois tests comportementaux, soit 4 lots de 15 souris.

Puis dans un deuxième temps, nous déterminerons la durée de persistance de l'effet. Cela requiert quatre expériences indépendantes (après 24 heures, 48 heures et une semaine soit 3 expériences avec 2 lots de 15 souris chacune).

Finalement, nous évaluerons les effets de la kétamine dans un modèle de dépression, le stress chronique imprédictible. Pour cela, 3 lots de 15 souris seront nécessaires.

Pour cette expérience, au total 195 souris sont requises.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglas, cartons et tubes)

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. L'étude des effets comportementaux repose sur l'observation de l'animal vivant et les études des mécanismes cérébraux requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité interindividuelle (n=15 sujets par groupe).

**8621** Le RCIU est une pathologie de la grossesse dont la fréquence et la gravité sont largement sous-estimées. Souvent associé à la prématurité qu'il aggrave, le RCIU, qui peut toucher jusqu'à 10 à 15 % des naissances, est grevé d'une augmentation importante de la mortalité in utero et néonatale. Chez les enfants survivants, le RCIU peut induire des pathologies et handicaps graves, touchant pratiquement tous les systèmes organiques, dont le système respiratoire (détresses respiratoires néonatales), la plupart des organes vitaux (rein, cœur, foie) et, tout particulièrement, la sphère neurologique.

Face à ce problème majeur de santé publique, les moyens d'intervention médicale sont aujourd'hui limités. Même si les hypothèses physiopathologiques sont de plus en plus nombreuses, et pointent en particulier vers un déficit de la fonction placentaire, les mécanismes profonds de la genèse et de la progression du RCIU restent ignorés. De plus, étant plus fragiles, les atteintes inflammatoires sont malheureusement très courantes chez les nouveaux né RCIU.

Nous utilisons un modèle basé sur le rat qui induit un retard de croissance et des lésions cérébrales chez les ratons nouveaux nés (lésions dues en particulier à un arrêt de la maturation des oligodendrocytes, à un retard de myélinisation et à une modification des cellules microgliales), ainsi que des différences de connectivité cérébrale (visualisées grâce à l'imagerie fonctionnelle ultrasound (fUS)). Il a également été mis en évidence une anomalie de l'alvéolisation des poumons, ainsi qu'une modification du nombre de cellules sanguines (plaquettes, érythrocytes et leucocytes).

Ces résultats chez le rat sont conformes à ceux retrouvés en clinique néonatale chez les enfants grands prématurés, indiquant la très bonne représentativité du modèle.

Des molécules potentiellement protectrices sur le cerveau et/ou le poumon ont par la suite été testées à certaines doses avec des résultats très encourageants car réduisant de nombreux marqueurs de la pathologie au niveau cérébral et pulmonaire.

Nous aimerions donc continuer nos expérimentations sur ce modèle et de tester l'action d'une atteinte inflammatoire due à l'injection d'il1b. Puis l'utilisation de molécules thérapeutiques, deux en particulier : la curcumine et l'ocytocine. Surtout, nous aimerions tester un nouveau moyen de délivrance des molécules : l'inhalation en aérosol par un système breveté de ventilation mécanique, afin de diminuer le processus invasif des injections ip. Nous comptons poursuivre cette étude sur 5 ans.

Pour tester nos deux molécules médicamenteuses, le nombre total d'animaux à utiliser est estimé à : 60 rates adultes et 704 ratons. Ces animaux permettront d'étudier à plusieurs time points les effets du modèle de régime hypoprotidique + inflammation à l'il1b et les effets de la molécule médicamenteuse, à l'aide de 3 outils expérimentaux : la PCR, l'immunohistologie et l'imagerie fUS.

L'étude de l'effet d'une molécule sur un organe aussi complexe que le cerveau ou le poumon ne nous permet pas d'utiliser pour le moment de méthodes de remplacement.

Cependant, afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer) notre projet comprend :

- utilisation d'un nouveau moyen de délivrance des molécules : l'inhalation en aérosol, afin de diminuer le côté invasif des injections intrapéritonéales (ip) habituellement utilisées (diminution de la douleur).

Les animaux seront particulièrement suivis par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à l'aspect, la mesure du poids et de la quantité de nourriture ingérée (femelles gestantes) et attention à l'aspect et la mesure quotidienne du poids pour les rats.

- lors de l'imagerie fUS, l'animal est anesthésié. Il est placé sur un tapis chauffant et sa température corporelle est mesurée par une sonde anale reliée au système de chauffage du tapis. Son rythme respiratoire est également suivi.

- pour utiliser le juste nombre d'animaux pour cette étude nous sommes basés sur nos résultats des études antérieures sur ce modèle. Il s'avère que la quantité de 8 animaux / groupe est la quantité adéquate pour nos analyses (en PCR, immunohistologie et imagerie fUS). Une fois les données relevées, les tests statistiques prévus sont le Mann - Whitney test pour la comparaison des 2 groupes entre eux et la Two-way ANOVA pour la comparaison de 4 groupes. Afin de maximiser l'utilisation des animaux de notre projet, nous voulons mener une double étude cerveau/poumon. Les 2 organes seront systématiquement prélevés lors des nos expérimentations.

**8622** Le nombre de nouveaux cas de cancers de la peau a plus que triplé entre 1980 et 2012 en France et près de 80 000 cancers de la peau sont diagnostiqués chaque année.

Le soleil est l'une des principales causes du cancer de la peau. Lorsque le rayonnement ultraviolet émis par le soleil atteint la peau, la surface de celle-ci en réfléchit une partie. Le rayonnement résiduel est ensuite diffusé dans les tissus situés juste sous la surface de la peau. Une fraction de ce rayonnement est alors absorbée par les cellules vivantes de la peau et a pour effet d'endommager les substances sensibles influant sur le développement et l'aspect normaux de la peau. Lorsqu'il y a exposition chronique au soleil, pendant plusieurs années, la peau endommagée devient alors un terrain propice à l'apparition d'une des formes de cancer de la peau. L'exposition au rayonnement ultraviolet accroît le risque de cancer de la peau (mais elle n'est pas forcément l'unique cause de la maladie).

Il est possible de traiter et de guérir le cancer de la peau sans qu'il y ait de graves conséquences; toutefois, dans certains cas, ce type de cancer peut être mortel s'il n'est pas décelé à temps. Le cancer de la peau est préoccupant pour les personnes qui travaillent au grand air, exposées au soleil de façon chronique (oreilles, front, bras, etc.). Dans les régions très ensoleillées, le cancer de la peau touche plus souvent les personnes sensibles au soleil. Les personnes atteintes d'une maladie génétique étant plus vulnérables au soleil, elles courent un risque accru de contracter un cancer de la peau.

Des études ont montré que le rayonnement ultraviolet imitant celui de la lumière solaire causait le cancer de la peau chez les animaux.

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité du peptide P9X en traitement préventif à 2 doses sur un modèle de cancer cutané induit par exposition répétée au rayonnement UVB chez la souris femelle Hairless Skh-1. Ce peptide pourrait en effet constituer un nouveau traitement pour lutter contre cette pathologie cutanée. Les 2 doses utilisées ont été déterminées selon les résultats d'un projet précédent au cours duquel nous avons étudié la courbe dose réponse et la cinétique après une ou plusieurs applications du peptide P9X à différentes doses chez la souris femelle Hairless Skh-1.

Nous utiliserons 80 souris femelles Hairless Skh-1 âgées de 6 semaines pour ce projet, réparties sur la base du poids en 4 groupes de traitement (20 souris/groupe) :

- Groupe 1 : traitement avec le véhicule sans induction de cancer cutané,
- Groupe 2 : traitement avec le véhicule et induction de cancer cutané,
- Groupe 3 : traitement avec le peptide P9X à la dose 1 et induction de cancer cutané,
- Groupe 4 : traitement avec le peptide P9X à la dose 2 et induction de cancer cutané.

Une semaine avant le début des traitements, les souris seront tatouées sous anesthésie gazeuse sur le dos afin de suivre l'apparition des lésions cutanées à l'aide d'une caméra digitale au niveau de la même zone cutanée pour chaque souris tout au long de l'expérimentation (Procédure 1). Les traitements seront réalisés quotidiennement pendant 11 à 22 semaines dans la matinée par application cutanée de véhicule ou de peptide P9X aux 2 doses à tester au large de la zone tatouée (Procédure 2). Les souris seront irradiées 3 fois par semaine pendant 10 à 21 semaines dans l'après-midi, en débutant 1 semaine après le début des traitements, en les plaçant sous un irradiateur générant des ultraviolets de type B (UVB) pour l'induction ou non de cancer cutané (Procédure 3). Le

suivi de développement des lésions cutanées sera réalisé 1 fois par semaine pendant les 10 à 21 semaines de l'expérimentation en plaçant les animaux sous anesthésie gazeuse et en utilisant une caméra digitale pour la prise de photos de la zone délimitée par le tatouage (Procédure 4).

La moitié des animaux sera euthanasiée après 10 semaines d'exposition aux rayonnements UVB et l'autre moitié à la fin des 21 semaines d'exposition, et des prélèvements de peau seront effectués au large de la zone tatouée et au niveau abdominal (zone non exposée aux rayonnements UVB) pour la réalisation d'analyses histologiques et biochimiques.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser les traitements pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Plusieurs observations quotidiennes avant et après traitement, après irradiation et après anesthésie pour le suivi de développement des lésions cutanées, et des pesées régulières seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20% par rapport au poids maximum atteint, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises, brûlures...) entrainera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux selon les recommandations éthiques.

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant d'étudier l'efficacité de composés après des applications répétées sur un organisme entier qui plus est sur une période aussi longue (Remplacement) et nous utiliserons le nombre minimum d'animaux et suffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du cancer cutané dans la population mondiale, le développement d'un nouveau traitement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des thérapies efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

**8623** Nos recherches sont centrées sur l'étude des cellules souches de la glande mammaire, cellules chargées d'assurer le renouvellement du tissu, dont le fonctionnement anormal pourrait être à l'origine des cancers du sein. Nous étudions une voie de signalisation pour son rôle central dans le développement des tissus.

L'organisation, le développement et la fonction de la glande mammaire sont très similaires entre la souris et l'Homme. Le modèle souris est ainsi essentiel pour étudier les composants cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement normal de ce tissu. Nous avons ainsi développé récemment une collection de souris transgéniques qui nous permettent d'évaluer l'expression de notre récepteur d'intérêt dans les cellules souches *in vivo*. Notre stratégie est basée essentiellement sur l'analyse du développement *in vivo* de la glande mammaire dans nos modèles de souris transgéniques.

Pendant les 5 prochaines années, nous allons étudier le développement de la glande mammaire de différentes lignées de souris transgéniques par imagerie intravitale, menant à l'analyse d'environ 108 souris au total. Nous allons étudier les dynamiques de différentes populations cellulaires pendant le développement de la glande mammaire. Les mécanismes impliqués l'auto-renouvellement des cellules souches, la différenciation et la spécification des lignées mammaires, et la façon dont cela se rapporte à la migration cellulaire et à l'organisation pendant la morphogenèse des ramifications de la glande mammaire, sont mal compris. Étant donné que la perturbation des programmes de développement normaux est un facteur clé de la tumorigenèse, une connaissance améliorée du développement de la glande mammaire normale est essentielle pour une meilleure compréhension de l'initiation et de la progression du cancer du sein.

Toutes les souris transgéniques qui seront utilisées dans ce projet ne présentent pas de phénotype dommageable ni pendant le développement embryonnaire ni à l'âge adulte.

Les interventions sur souris vivantes incluent des injections intrapéritonéales non douloureuses et une légère chirurgie pour l'insertion des fenêtres d'imagerie.

Toutes les précautions sont prises pour minimiser la souffrance par exemple : anesthésie pendant les procédures chirurgicales, administration d'analgésiques post opératoires, et contrôle régulier des souris. Le nombre de souris utilisé est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats pertinents.



Pour minimiser le nombre d'animaux, des informations seront obtenues aux niveaux phénotypiques, cellulaires et moléculaires à partir du même animal. Pour cela, une fois l'imagerie in vivo réalisée, toutes les glandes mammaires seront prélevées pour des analyses ultérieures. La stratégie d'élevage des souris transgéniques utilisées est optimisée pour obtenir les cohortes de souris appropriées. Nous allons aussi utiliser des méthodes alternatives qui remplacent l'utilisation d'animaux, en particulier par des cultures de cellules appelées organoïdes en 3D qui permettent de modéliser la morphogénèse et le comportement des cellules souches in vitro. Cependant, les "organoïdes" étant composés exclusivement de cellules épithéliales et la culture in vitro pouvant affecter le destin cellulaire, nous aurons absolument besoin d'effectuer des expériences chez les souris afin de visualiser la morphogénèse de la glande mammaire in vivo, dans son microenvironnement naturel et dans son contexte physiologique.

Les expériences proposées sont nécessaires pour notre projet qui permettra de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la fonction des cellules souches mammaires et leur rôle dans le développement normal et tumoral.

**8624** Les protéines CRMP (Collapsin-Response Mediated Proteins) sont au nombre de 5 et sont impliquées dans plusieurs fonctions neuronales. Parmi ces fonctions, la protéine CRMP2 diminue le seuil de douleur chez la souris. Des interactions entre les protéines CRMP2 et CRMP5 sont connues dans le développement neuronal.

Nous souhaitons ainsi démontrer que CRMP5 peut également jouer un rôle dans les processus douloureux. Nous disposons d'une souche de souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas la protéine CRMP5. Nous étudierons le seuil de perception douloureuse chez les souris en fonction de leur statut génétique : type sauvage, hétérozygote, mutant. Ces expérimentations ont pour objectif futur de permettre de concevoir la protéine CRMP5 comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des douleurs neuropathiques. Ces expérimentations se dérouleront en veillant à respecter les règles de bien-être des animaux, le remplacement des animaux n'est pas possible, pour raffiner notre étude, nous réaliserons des tests de douleur ne produisant pas de lésions : le test des filaments de Von Frey, le test de rétraction de la queue et le test de la plaque chauffante. Également pour limiter la perception douloureuse, les températures utilisées pour les tests de chaleur seront fixées au plus bas parmi les données de la littérature scientifique. Pour réduire l'usage des souris, après un temps de latence, chaque souris sera soumise aux 3 tests.

Cette demande consistera en une étude en 2 phases. Une phase pilote réalisée sur 5 animaux de chacun des 2 sexes et de chacun des 3 génotypes afin d'évaluer l'existence d'un effet de la présence de la protéine CRMP5 sur la perception douloureuse et de pouvoir calculer l'effectif nécessaire pour la poursuite de l'étude avec un test de puissance fixé à 80% de chance de réussite. L'étude serait interrompue si ce test de puissance devait aboutir à un usage supérieur à 240 du nombre de souris.

**8625** Les leucémies aiguës (LA) sont des maladies hétérogènes de pronostic variable mais généralement sombre pour une grande majorité des patients âgés. Il est donc d'une nécessité absolue de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de prendre en charge ces patients. Une cible de choix est la famille des LIMkinases qui sont des molécules impliquées dans le développement des LA, en particulier dans le processus métastatique.

Dans le cadre de ce projet, nous allons évaluer l'intérêt thérapeutique d'un nouvel inhibiteur des LIMKinases dans le traitement d'un sous-groupe de LA. Cette évaluation se fera sous forme de monothérapie et en combinaison avec des inhibiteurs déjà utilisés en clinique mais qui sont peu satisfaisants compte tenu de leur réponse thérapeutique de courte durée lié à des mécanismes de résistance.

L'efficacité de ce nouvel inhibiteur de LIMKinase a été tout d'abord évaluée in vitro sur un large panel de lignées cellulaires leucémiques humaines. Des résultats encourageants ont été obtenus dans deux lignées leucémiques d'un sous-type particulier de LA. En effet, ces cellules se sont avérées être sensibles au traitement par cet inhibiteur (diminution de la viabilité cellulaire). De plus, un effet synergique a été observé après combinaison de cet inhibiteur avec d'une part le Nilotinib et d'autre part le Ponatinib, qui sont deux inhibiteurs actuellement commercialisés et utilisés pour le traitement de patients atteints de LA.

Il est maintenant nécessaire de poursuivre la caractérisation et l'évaluation de ce nouvel inhibiteur en combinaison avec le Nilotinib ou le Ponatinib dans un modèle murin mimant la LA. Cette étape in vivo nous permettra de valider les résultats obtenus in vitro et d'envisager la mise en place d'un essai thérapeutique chez des patients.

Le modèle murin utilisé consistera à injecter par voie intraveineuse des cellules murines leucémiques à des souris C57BL/6 normales. Ce modèle est déjà utilisé par d'autres équipes et le développement de la maladie est bien caractérisé. Les traitements seront administrés, par voie orale ou par voie intrapéritonéale, précocement (3 jours après l'induction dans la leucémie chez la souris).

La prise en compte de la règle des 3R fait partie intégrante de la conception des protocoles expérimentaux de ce projet. Les approches in vitro ont permis en première instance d'établir une preuve du concept, minimisant le besoin d'études in vivo. Nous avons également conçu ce projet en réduisant le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique de type ANOVA qui nous permet des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux (ce projet nécessitera 260 animaux sur 2 ans). Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux. Les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, poils hérissés, dos voûté, agressivité) seront euthanasiées selon la méthode réglementaire. De plus, les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

**8626** Le système endocannabinoïde (SEC), est un système biologique complexe mettant en jeu des molécules analogues à celles trouvées dans le cannabis et impliqué dans de nombreuses fonctions. Ce système est essentiellement composé de 2 récepteurs (CB1R et CB2R) et de 2 molécules produites par l'organisme appelées endocannabinoïdes. L'activation du SEC et de CB1R en particulier favorise le stockage des graisses et ralentit le métabolisme énergétique chez l'homme et le rongeur. Il apparaît qu'un blocage pharmacologique de CB1R dans les tissus dits périphériques tels que le foie ou les muscles permette de lutter efficacement contre l'obésité et ses conséquences délétères chez le rongeur. Cependant la compréhension des mécanismes et leurs implications sont encore loin d'être élucidées.

Notre équipe possède une expertise et un intérêt reconnu pour l'étude du métabolisme des graisses dans le foie au cours de l'obésité et plus particulièrement pour les nombreux troubles liés à la production et l'accumulation de lipoprotéines de basse et très basse densité, généralement appelé « mauvais cholestérol ». Même si à ce jour de nombreuses approches permettent de réduire les taux de « mauvais cholestérol », aucun traitement pharmacologique ne donne entière satisfaction concernant les capacités à réduire le risque cardio-vasculaire à long terme. C'est pourquoi il est nécessaire d'explorer de nouveaux mécanismes afin de développer à terme de nouveaux agents thérapeutiques. Ainsi, ce projet a pour objectif :

- 1) de déterminer comment la sur-activation du SEC rencontrée au cours de l'obésité est associée à une altération de la production/sécrétion de « mauvais cholestérol » par le foie.
- 2) d'étudier l'impact de l'inflammation dans ce processus.

L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet d'une part du fait de l'absence d'outils pharmacologiques qui auraient pu permettre la mise en place d'une étude clinique et d'autre part par le besoin d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués dans cette pathologie multifactorielle. De plus, Il n'est pas possible d'étudier tous ces aspects et mécanismes en se limitant à des approches in vitro.

Ainsi, nous utiliserons 260 souris mâles adultes qui seront soumises soit à un régime alimentaire standard, soit à un régime alimentaire enrichi en graisse (de l'ordre de 60%) afin d'induire une obésité. Notre étude portera sur plusieurs modèles murins dont des animaux génétiquement modifiés chez lesquels CB1R est soit totalement absent soit seulement éliminé dans une population de cellules immunitaires. Les lignées génétiquement modifiées ne devraient pas développer de phénotype

dommageable. Cependant, nous opérerons un suivi des élevages afin de détecter tout dommage imprévu et ainsi intervenir pour soulager/abrèger toute souffrance.

Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une obésité suite à un régime riche en gras. Cependant, dans un souci de réduction et en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », les souris femelles issues des croisements des différents élevages pourront être utilisées pour étudier les cellules primaires du foie in vitro, ainsi que pour la mise au point de certaines techniques.

De plus, les souris auront à leur disposition divers éléments de raffinements et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs ou le personnel qualifié des animaleries. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Nous avons également limité au maximum l'utilisation d'animaux pour les études mécanistiques en complétant cette approche par l'utilisation d'une approche in vitro sur différentes lignées cellulaires.

D'autre part, bien que notre intérêt principal concerne le métabolisme des graisses dans le foie, nous nous efforcerons de collecter tous les autres tissus métaboliques des animaux afin de mettre en place une banque d'organe nous permettant de mutualiser les échantillons et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaire pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

Nous espérons que ces travaux permettront de mieux comprendre le rôle du SEC dans les perturbations du métabolisme des graisses associées à l'obésité. Nous pensons que ce projet nous permettra également de mieux appréhender le rôle du SEC dans le contexte de l'inflammation associée à l'obésité et à la résistance à l'insuline. Enfin, nos résultats pourraient conduire à l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques pour le traitement des pathologies associées à l'obésité.

**8627** Cette formation s'adresse aux étudiants de deuxième année après le baccalauréat, destinés à la profession de technicien de laboratoire. Dans une structure de recherche publique ou privée, ils peuvent donc être amenés à travailler sur des animaux vivants. Par conséquent, ces étudiants doivent être formés aux techniques utilisées en expérimentation animale et obtenir un diplôme d'expérimentation animale de niveau praticien.

Depuis plus de 19 ans, notre établissement propose une formation d'habilitation animale de niveau praticien, intégrée à la formation initiale. Cette formation a pour objectif de former ces étudiants aux techniques peu invasives et d'évaluer leurs aptitudes pratiques. Ces deux objectifs sont déjà intégrés dans l'autorisation à délivrer la formation à l'expérimentation animale niveau praticien (renouvelée en 2015).

Le contrôle pratique sera réalisé individuellement.

Le projet nécessitera d'utiliser 580 animaux sur 5 ans pour 150 étudiants (250 rats et 330 souris).

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé de manière à prendre en compte le degré de stress et/ou de douleur potentiellement occasionné chez l'animal, tout en permettant une bonne formation pratique des étudiants.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe socialement harmonieux en fonction de la taille de la cage, du poids des animaux et de l'espèce, et en présence de deux éléments d'enrichissement (tunnel en plastique et bâton à ronger ou noix pour les rats; papier absorbant et une petite maison en polycarbonate ou en carton pour les souris). Avant toute intervention sur l'animal, les étudiants auront visionné les différentes procédures à exécuter sur des vidéos et également en démonstration par les enseignants. La pratique des étudiants sur l'animal ne sera réalisée que sous contrôle rigoureux des enseignants. Une attention particulière sera portée sur la nécessité de travailler dans le calme afin d'éviter tout stress inutile chez l'animal. Les animaux (rats et souris) ayant servi à l'apprentissage étant réutilisés pour le contrôle, il y aura au minimum une semaine d'écart entre les deux séances afin d'éviter tout stress aux animaux.

Remplacement : Afin de valider la formation réglementaire à l'expérimentation animale (niveau praticien), il est nécessaire que les étudiants pratiquent les techniques les plus usuelles et les moins invasives sur animal vigile. Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux dans le cadre de cette formation

**8628** Le but de ce projet est de former, entraîner et/ou ré-entraîner les utilisateurs à la réalisation/maîtrise de techniques d'administration et de prélèvement.

Cette formation/réentraînement s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures expérimentales, détenteurs d'un niveau concepteur ou réalisateur en expérimentation animale et souhaitant être encadrés pour la réalisation de certains gestes techniques afin d'apprendre à travailler en totale autonomie et en aisance technique.

Les gestes expérimentaux seront : administration d'un composé en voie SC (sous-cutané), en IM (intramusculaire) en ID (intradermale), en IP (intrapéritonéale), en IV (intraveineuse (veine de la queue, sinus rétro-orbitale)). Administration d'un composé par voie orale (gavage), administration d'un composé par voie intratibiale.

Effectuer des prélèvements sanguins, des prélèvements d'urine, des prélèvements de LCR (liquide céphalo rachidien), des prélèvements de bile.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque utilisateur. Pendant toute la période précédant la mise en œuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages destinés à l'euthanasie et les procédures seront sans réveil et dans lesquelles les animaux seront anesthésiés (générale + locale), analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffants. Cependant, les administrations d'un composé par voie IV (veine de la queue) et par voie orale (gavage) pourront être pratiquées sur animaux vigiles et dans le cadre d'une procédure classée légère.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux de réforme issus des élevages. Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 300 souris et 200 rats maximum.

**8629** Le but de ce protocole est de permettre d'établir l'efficacité d'une naturothérapie dans les intoxications prénatales au plomb et au manganèse.

L'intoxication au plomb et/ou au manganèse peut exercer des effets néfastes sur le développement, en particulier celui du système nerveux central. Elle se caractérise principalement par des atteintes des fonctions émotionnelles et de la mémoire.

La menthe verte (*Mentha spicata*) est connue pour ses propriétés neuroprotectrices.

Nous faisons donc l'hypothèse que son administration pourrait contrecarrer les effets d'une intoxication au plomb et/ou au manganèse.

Pour cette expérimentation 300 souris maximum seront utilisées.

Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude :

Remplacement : aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. L'étude des effets sur les comportements émotionnels et sur la mémoire repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Les études cérébrales requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=8 sujets par groupe expérimental). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

**8630** Le « moyamoya » est une maladie vasculaire cérébrale rare. Elle se caractérise par une réduction anormale et progressive du diamètre des gros vaisseaux entrants dans le crâne (artères carotides) et s'étend parfois aux artères de la base du cerveau. En conséquence, le manque d'oxygène dans le cerveau entraîne le développement d'un réseau de nouveaux petits vaisseaux anormaux, fins, tortueux et denses, en forme de « nuage de fumée » (ou « moyamoya » en Japonais). L'âge de début du moyamoya est variable avec cependant une fréquence plus importante chez le jeune enfant, puis chez les patients vers 40 ans. Les manifestations de cette affection sont des accidents vasculaires cérébraux de type ischémiques, des hémorragies cérébrales et des céphalées (maux de tête). Il n'existe pas de traitement pharmacologique pour stopper l'évolution de la maladie. A ce jour, les

mécanismes responsables de la maladie sont encore largement inconnus et il n'existe aucun modèle animal de cette affection. Au cours des dernières années, plusieurs gènes impliqués dans cette maladie ont pu être identifiés, ce qui constitue une première étape dans la compréhension des mécanismes impliqués. Aujourd'hui, pour permettre de faire avancer les connaissances, dans l'espoir d'identifier des cibles thérapeutiques pour les patients, nous avons besoin de modèles animaux de la maladie. La souris est un modèle animal qui possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'homme. Il existe des souris mutées dans certains gènes identifiés dans le moyamoya mais aucune exploration de leurs vaisseaux cérébraux n'a pas été réalisée. Nous avons pu obtenir par collaboration 4 lignées différentes de souris porteuses de mutation dans 3 des gènes impliqués dans la maladie.

L'objectif de notre étude est dans un premier temps de déterminer si l'une de ces lignées de souris pourrait être un bon modèle de moyamoya. Dans le cas où un modèle adéquat serait identifié, nous définirons l'histoire naturelle du développement des anomalies vasculaires dans le cerveau des souris moyamoya et chercherons à définir les mécanismes responsables du développement de la maladie. Les 3 procédures expérimentales de notre projet sont mises en œuvres par des personnes expérimentées et sont utilisées depuis de nombreuses années au laboratoire.

La procédure n°1 consiste en l'injection d'un composé permettant d'inactiver l'un des gènes du moyamoya pour observer si cela permet de déclencher le développement de la maladie chez la souris, comme c'est le cas chez l'homme. L'inactivation sera réalisée 1/ chez le souriceau (pour mimer la maladie affectant les enfants) 2/ chez l'animal de 1 mois (pour mimer la maladie chez les patients adultes). Cette procédure concernera 2 des 4 lignées de souris du projet (total de 182 souris maximum).

La procédure n°2 (prélèvement sanguin sur animal anesthésié) nous permettra de réaliser des dosages de marqueurs dans le sérum (par exemple marqueurs circulants favorisant le développement des vaisseaux) au cours du développement de la maladie.

La procédure n°3 (perfusion sur animal anesthésié) permettra d'enlever le sang résiduel contenu dans les vaisseaux du cerveau et de faciliter ainsi la mise en évidence des anomalies vasculaires par imagerie. Cette dernière procédure sera réalisée pour chacun des animaux impliqués dans ce projet. Nous analyserons 10 souris par lignée moyamoya candidate et réduirons le nombre de contrôles à 3 animaux par lignée. Ce nombre d'animaux nous semble adéquat pour 1/ écarter une lignée qui n'aurait révélé aucune anomalie vasculaire cérébrale et 2/ réaliser des tests statistiquement fiables sur des paramètres quantifiables (par exemple diamètre des artères) en cas d'anomalie vasculaire présente (comparaison de 2 groupes : contrôles versus moyamoya, par test Student bilatéral). Chaque lignée moyamoya candidate sera analysée à différents temps (chez le souriceau, le jeune puis l'adulte) pour permettre de caractériser l'évolution de l'anomalie vasculaire au cours du temps. Le nombre total d'animaux pour l'ensemble du projet sera au maximum de 260 souris.

Les animaux sont maintenus dans les conditions standards d'hébergement avec un raffinement dédié et spécialisé systématique que les animaux apprécient pour confectionner un nid ou un abri. Ils seront surveillés quotidiennement par une personne responsable du bien-être du projet. Ils feront l'objet d'un examen hebdomadaire scoré, basé sur les points limites prédéfinis, de façon à déceler tout signe de souffrance éventuel (suivi du poids, comportement et aspect de l'animal). En cas d'apparition de signes de souffrance nous procéderons à l'euthanasie de l'animal et à son analyse.

**8631** La pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) sont les principales complications de la grossesse, avec une morbi-mortalité maternelle et fœtale accrue. Il est maintenant largement reconnu que ces pathologies, qui affectent 4 à 7% des grossesses, sont en relation avec une hypoperfusion du placenta. Cette hypoperfusion conduit à différents désordres dont à une dérégulation de la production de radicaux libres qui affecte le tissu placentaire et l'endothélium maternel.

Notre objectif consistera à s'appuyer sur un modèle pharmacologique d'hypoperfusion placentaire, déjà publié, caractérisé par un défaut de production de ces radicaux libres afin de tester deux nouvelles électrosondes spécifiques de ces radicaux sur le tissu placentaire à la fois par des approches in vitro ou in vivo.

Pour ce projet, le recours à un modèle animal est indispensable puisqu'il nécessite d'avoir accès à des placentas normaux et pathologiques. Le modèle d'hypoperfusion placentaire sera généré chez le lapin en raison de son type de placentation plus proche du placenta humain et comme décrit dans la littérature. Au cours du protocole, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance

Ce programme prévoit le recours à un minimum nécessaire de 42 animaux provenant d'élevages autorisés. De plus, lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Ce modèle d'hypoperfusion implique de tester deux doses de composés pharmacologiques et de tester deux types d'électrosonde :

- l'une dédiée à l'approche in vitro (culture de fragments de placenta)
- l'autre dédiée à l'approche in vivo (directement dans le tissu placentaire).

**8632** Les traitements ciblant les antigènes des tumeurs constituent une approche thérapeutique complémentaire des traitements classiques en oncologie que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

Un candidat de ce type a été généré par l'un de nos partenaires et des données d'un essai clinique de phase II montrent que ce candidat augmente l'efficacité de la chimiothérapie chez les patients. Cependant, il est nécessaire de développer de nouvelles approches, afin d'améliorer l'efficacité de ce candidat. Les travaux réalisés précédemment ont permis de démontrer que des molécules affectant le système immunitaire peuvent augmenter l'effet thérapeutique du candidat.

Le projet se propose d'évaluer en modèle murin, l'efficacité de la combinaison de ce candidat avec une molécule permettant d'améliorer son efficacité. Dans un premier temps, l'impact du composé agissant sur le système immunitaire sur la survie des souris sera évalué puis dans un deuxième temps son mode d'action sera étudié.

Un protocole utilise 72 animaux et nous envisageons au maximum 5 études sur ce schéma. Un nombre maximal de 360 animaux est ainsi envisagé pour ce projet.

Réduction : Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été validé grâce aux données précédente dans des projets de ce type et constitue le minimum nécessaire pour obtenir une conclusion tout en réduisant autant que possible le nombre d'animaux utilisés. Les procédures sont reproduites au minimum deux fois afin de valider les résultats obtenus.

Raffinement : Des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (prostration, poil hirsute, amaigrissement) sont mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Remplacement : L'utilisation d'un modèle animal s'impose par la nature du produit d'immunothérapie qui ne possède pas d'activité directe sur la tumeur après son administration, mais vise à générer ou amplifier des réponses immunitaires conduisant à la destruction des tumeurs. Il n'y a pas de méthode in vitro disponible pour générer les réponses immunitaires. La souris est un modèle de référence en oncologie et de nombreux outils permettant de caractériser les réponses immunitaires sont disponibles dans cette espèce. Cette espèce présente en outre les avantages de se reproduire rapidement. Nous n'utiliserons que des souris femelles.

Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité de notre produit en association avec un composé immunomodulateur dont le but d'élaborer un nouveau candidat permettant d'améliorer l'action du produit actuel.

**8633** La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales avec une incidence d'environ 3 nouveaux cas par an pour 100000 habitants et un risque d'environ 1/800 de décéder de SLA ou de DFT. Une des formes familiales de SLA est causée par des mutations dans le gène FUS, qui code pour une protéine nucléaire. Ces mutations du gène FUS perturbent la localisation de la protéine, ce qui induit son accumulation dans le compartiment cytoplasmique et une agrégation de FUS. Cette protéine FUS est un également composant majeur des inclusions protéiques développées par une partie des cas sporadiques de

DFT, appelés DFT-FUS. Ainsi, l'agrégation cytoplasmique de la protéine FUS est un événement caractéristique d'une partie des cas de SLA et de DFT, regroupée sous le terme de FUS-opathies.

L'anatomopathologie suggère que la neurodégénérescence est directement corrélée à la redistribution cellulaire de FUS. Nous posons l'hypothèse que l'événement pathogénique primaire serait dû à une diminution de la capacité de FUS à réaliser ses fonctions nucléaires normales, et notamment sur la régulation transcriptionnelle des gènes. Ainsi, au cours des FUS-opathies, une diminution de FUS présent dans le noyau pourrait altérer les régulations de la chromatine, et incidemment, l'expression des gènes.

Notre hypothèse de travail est que la baisse de FUS dans le noyau va entraîner des changements de la chromatine et incidemment, des programmes génétiques associés. Ceci pourraient sous-tendre une perturbation des fonctions cognitives (la formation de la mémoire en particulier) et/ou les déficits neurologiques observés. Cette étude fait appel à un nouveau modèle de souris transgéniques produisant l'accumulation anormale de FUS dans le cytoplasme (protéine FUS mutée sur son domaine de translocation nucléaire). Nous étudierons les conséquences de la perte de FUS dans le noyau, sur la régulation de la composition de la chromatine et sur la mémoire, par des approches d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) et transcriptomiques (RNA-seq) en fonction de l'âge des souris. Nous travaillerons avec 9 groupes de 26 souris mâles, soit 234 souris. L'identification des événements associés à la mauvaise localisation de FUS nous permettra de concevoir des interventions thérapeutiques innovantes.

Règle des 3R. Remplacement : L'évaluation des performances de mémoire ne peut se faire que chez un animal dans un test comportemental. A ce jour, les modèles in vitro ne peuvent pas rendre compte de la complexité des fonctions impliquées dans les performances cognitives d'un individu. Les analyses moléculaires ne sont possibles qu'à partir de tissu cérébral prélevés au cours de la cinétique du processus mnésique. Réduction : Le nombre total de souris (234), a été réduit au minimum pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris car il existe une dispersion des performances de mémoire et des signalisations moléculaires chez les animaux pathologiques. Raffinement : afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance, les animaux sont manipulés 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. Ces manipulations permettent de réduire le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage et de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction).

Conditions d'hébergement : La température des salles d'animalerie et le cycle jour/nuit sont maintenus à 23°C ± 1°C et 12h/12h, respectivement (toutes les salles sont munies de sondes couplées à des alarmes lumineuses). Toutes les souris ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Elles sont maintenues en cage par 4 au maximum, plusieurs cages par rangée sur le rack de façon à ne jamais laisser une cage isolée. Un papier absorbant est mis dans chaque cage pour faire un nid. Un ou deux barreaux de bois à ronger sont également rajoutés. Les souris WT proviennent de notre fournisseur (pas de reproduction sur place). Elles sont mises en cage par 4 dès leur arrivée au laboratoire. Elles bénéficient d'un minimum de 3 semaines d'acclimatation au laboratoire.

**8634** Avec plus de 800 000 personnes atteintes en France, la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées représentent la première cause de perte des fonctions intellectuelles liée à l'âge. La caféine, la drogue psychoactive la plus consommée au monde, favorise l'éveil, les processus attentionnels et le traitement de l'information. De plus, une consommation régulière mais modérée de caféine améliore la mémoire au cours du vieillissement et réduit le risque de développer une démence. Au niveau pharmacologique, la caféine bloque les récepteurs adénosinergiques, et plus particulièrement les récepteurs A2A. Dans le cerveau, les récepteurs A2A sont présents au niveau des neurones et des astrocytes et sont idéalement placés au sein des structures cérébrales clés dans le contrôle des fonctions cognitives.

Chez l'Homme, une augmentation anormale d'expression neuronale et astrocytaire, des récepteurs A2A, a été associée à différentes pathologies cognitives telles que la schizophrénie et les maladies neurodégénératives et à différentes situations présentant des troubles cognitifs comme le

vieillesse, le stress chronique et les troubles attentionnels. Cette dérégulation serait donc au carrefour de différentes affections. De plus, le blocage des récepteurs A2A améliore notablement les performances mnésiques dans différentes situations neurodégénératives où elles sont altérées (modèles de la maladie d'Alzheimer, modèles de la maladie de Huntington). Cependant, les mécanismes moléculaires liant la fonction des récepteurs A2A et la régulation des processus cognitifs en conditions physiologique ou pathologique restent largement méconnus.

Dans ce contexte, ce projet vise à mettre en évidence les voies de signalisation moléculaires associées aux déficits comportementaux induits par une dérégulation neuronale ou astrocytaire des récepteurs A2A à l'aide de nouveaux modèles de souris transgéniques permettant une expression spécifique des récepteurs A2A, soit dans les neurones, soit dans les astrocytes.

Nous travaillerons avec 6 groupes de 26 souris mâles par groupe, soit 156 souris. La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre l'impact de la caféine sur la sphère cognitive.

Règle des 3R. Remplacement : L'évaluation des performances de mémoire ne peut se faire que chez un animal dans un test comportemental. A ce jour, les modèles in vitro ne peuvent pas rendre compte de la complexité des fonctions impliquées dans les performances cognitives d'un individu. Les analyses moléculaires ne sont possibles qu'à partir de tissu cérébral prélevés au cours de la cinétique du processus mnésique. Réduction : Le nombre total de souris (156), a été réduit au minimum pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris car il existe une dispersion des performances de mémoire et des signalisations moléculaires chez les animaux pathologiques. Raffinement : afin de minimiser l'anxiété, la douleur et la souffrance, les animaux sont manipulés 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. Ces manipulations permettent de réduire le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage et de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction).

**8635** Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupant la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), affectent 2 personnes sur 1000 dans les pays développés. Ces maladies sont en émergence dans les pays en voie de développement et leur incidence explose chez l'adolescent dans les pays développés. Les MICI sont un problème de santé publique pour lequel une prise en charge préventive reste à développer. Ce sont des maladies complexes où interviennent des facteurs de risque (FDR) génétiques et environnementaux. Plus de 200 gènes de susceptibilité sont répertoriés, dont le principal est NOD2 pour la MC. Les FDR environnementaux sont moins connus alors qu'il est urgent de les identifier pour tenter de réduire la fréquence de la maladie dans la population générale. A ce jour, les seuls FDR environnementaux identifiés sont le tabac, protecteur dans la RCH et aggravant dans la MC, l'utilisation d'antibiotiques dans l'enfance, et les infections entériques associées la MC.

Ce projet a pour objet de mettre en évidence le rôle de 4 contaminants alimentaires dans la physiopathologie des MICI. Dans ce but, l'intoxication par les contaminants alimentaires sera menée en conditions basales ainsi que sur plusieurs modèles reproduisant chacun une composante physiopathologique des MICI. Les intoxications en conditions basales se feront à court terme (10 jours) et de façon chronique (9 mois). Les modèles pathologiques seront : 1) la colite induite par le TNBS. 2) la colite induite par le DSS. 3) le modèle de cicatrisation muqueuse suite à une colite par le DSS. 4) l'entérite induite par l'indométhacine. 5) la colite infectieuse induite par *Citrobacter Rodentium*. 6) la colite spontanée chez les souris IL10 KO.

Les types d'expérimentation mis en œuvre le seront dans un souci de rigueur scientifique afin de garantir la pertinence scientifique des résultats, et dans un souci de préservation du bien-être des animaux.

Les études seront basées sur une étude bibliographique rigoureuse, et toute donnée in vitro manquante sera déterminée préalablement aux études chez l'animal.

Pour réduire au minimum le nombre d'animaux, les études en conditions basales seront analysées de façon approfondie et exhaustive, afin de déterminer la pertinence de continuer les études et de choisir les modèles pathologiques les plus appropriés.



Pour réduire l'angoisse, les procédures classiques seront appliquées : pas de bruit inutile et stressant, phase d'acclimatation pour tout changement d'environnement, enrichissement, application des procédures pour le nombre de souris par cage.

Pour réduire la souffrance, les souris seront pesées et surveillées cliniquement quotidiennement. Les points limites surveillés seront : perte de poids >15%, poil hérissé, prostration, plaie. Ils entraîneront l'euthanasie de la souris.

Etude statistique : les analyses statistiques seront effectuées via le test Mann Whitney adapté au nombre d'échantillons faible.

Ce projet nécessitera pour 5 ans un nombre maximal estimé de 3840 souris.

**8636** *Pseudomonas aeruginosa* est une des principales bactéries responsables de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, complications réanimatoires grevées d'une lourde mortalité. La prise en charge de ces infections est certes rendue complexe par l'existence fréquente de résistances aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*, mais il est également maintenant largement admis que la stérilisation des poumons par une antibiothérapie efficace ne suffit pas à garantir la guérison. Au cours d'une infection bactérienne, une réponse de l'hôte se met en place avec le recrutement de cellules immunitaires ainsi que la production de molécules inflammatoires dans le but de contrer cette infection. Cette réponse doit être mesurée afin d'éliminer l'agent pathogène sans créer de lésions trop importantes dans l'organisme. Les dégâts provoqués par une réponse inflammatoire excessive impactent en effet lourdement le pronostic du patient. La maîtrise de cette réponse inflammatoire apparaît donc être une clé vers l'amélioration des pronostics.

Antibiotique possédant des propriétés anti-inflammatoires, l'azithromycine est utilisée dans les pathologies conduisant à des états inflammatoires chroniques des voies respiratoires. L'utilisation de ces propriétés anti-inflammatoires dans la prise en charge d'infections respiratoires aiguës à *P. aeruginosa* (naturellement résistant à l'azithromycine) a été récemment envisagée et semble prometteuse. Les mécanismes d'action et les effets précis de cette molécule sur la réponse inflammatoire de l'hôte ne sont cependant que peu étudiés.

Le but de notre étude est de caractériser précisément chez la souris les effets non-antibiotiques de l'azithromycine sur la réponse inflammatoire survenant dans les suites d'une infection respiratoire aiguë à *P. aeruginosa*. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettra de conforter l'intérêt de cette molécule dans la prise en charge des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez l'Homme et de les proposer en thérapeutique en complément d'une antibiothérapie adaptée et efficace, telle que la ceftazidime.

982 souris Swiss femelles et 256 souris femelles fond génétique C57/B6 seront utilisées soit 1238 souris au total.

Le travail sera divisé en deux étapes :

1. Détermination de la posologie optimale d'azithromycine à administrer chez la souris : des dosages de la molécule seront réalisés à différents temps post-administration.

2. Effets de l'azithromycine sur la réponse inflammatoire : après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons) à *P. aeruginosa*, les poumons des souris seront prélevés afin d'analyser la réponse immunitaire.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). La réponse inflammatoire d'un organisme exposé à une infection est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreux acteurs, moléculaires et cellulaires. L'évaluation de l'effet de l'azithromycine sur la réponse inflammatoire ne peut de ce fait être réalisée *in vitro* et doit impérativement être réalisée sur un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec une évaluation bi-quotidienne des signes généraux. Une grille d'appréciation a été mise en place afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal.

**8637** L'ischémie-reperfusion (IR) est un processus inhérent de la transplantation d'organe. Celui-ci est responsable de dommages à l'origine du dysfonctionnement du greffon, conduisant à une reprise de fonction retardée, puis au rejet du greffon dans les cas les plus extrêmes.

La molécule (CHC) est une macromolécule composée de chaînes multiples d'héparine susceptible d'induire un effet bénéfique en se fixant sur la barrière endothéliale et la protégeant ainsi des dommages induits par l'IR. Ce projet aura pour but d'apporter des données supplémentaires à celles déjà obtenues lors d'études in vitro, ex vivo et in vivo.

L'efficacité de la molécule CHC sera évaluée sur modèle porcin mimant un donneur décédé à cœur arrêté (DCD). Ce modèle préclinique, mature et validé, présente tous les avantages d'un travail translationnel.

En effet, la proximité morphologique (taille et poids), physiologique et anatomique du rein porcin (multilobé et multipapillaire) en fait un modèle transposable à l'Homme.

La transplantation d'organe n'est applicable qu'à un organisme vivant ; par conséquent, "3R Remplacer" ne peut s'appliquer ici.

Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire, grâce à : i) l'intervention de chirurgiens et personnels expérimentés, ii) grâce à l'exploitation d'un modèle pré-clinique et publié à plusieurs reprises (3R Réduire).

Enfin, la prise en charge des animaux est très similaire à celle d'un patient hospitalisé (application médicamenteuse avec anesthésiques-analgésiques, suivi sanguin : 3R Raffiner).

Pour ce projet, l'effectif demandé est de 2+2 animaux soit un total de 4 animaux.

On réalise ici un protocole simple et proche à celui d'un protocole clinique. Après une ischémie chaude (37°C) in vivo (mimant le DCD), le greffon rénal est placé (ex situ) dans une solution standard de préservation (UW) à 4°C, en présence ou non de CHC, pendant 24h. A la fin de cette préservation, nous réalisons une autotransplantation avec néphrectomie contralatérale et un suivi post-opératoire d'un mois.

Ce protocole préclinique fournira des informations importantes sur l'effet bénéfique du CHC en préservation à froid ; il confortera les résultats obtenus précédemment et permettra d'aboutir à une application rapide en clinique humaine.

**8638** L'objectif de ce projet est l'organisation de travaux pratiques dans le cadre de l'enseignement réglementaire de la chirurgie pour l'enseignement de la gestion de l'anesthésie, de l'asepsie et de la douleur au cours d'un acte chirurgical réalisé chez la souris. Les étudiants auront préalablement reçu des informations théoriques en présentiel et des démonstrations d'actes de chirurgie à l'aide de vidéos.

Ils auront également pu s'entraîner à la réalisation de sutures sur des supports inertes.

La première procédure portera sur la gestion de l'anesthésie. Pour cela, des souris seront anesthésiées soit avec une anesthésie gazeuse, soit par injection d'anesthésiques chimiques à plusieurs doses. La diminution de la température corporelle sera évaluée. La durée de l'induction, les moyens d'évaluer la profondeur de l'anesthésie et la rapidité de réveil seront étudiés pour mettre en évidence les avantages et les inconvénients des différents types d'anesthésie.

La deuxième procédure sera une procédure chirurgicale. Une laparotomie (c'est à dire ouverture du plan cutané et musculaire de l'abdomen) sera réalisée chez des souris après anesthésie, préparation du champ opératoire, contrôle de la profondeur de l'anesthésie. La fermeture des plans musculaire et cutané sera ensuite réalisée au moyen de sutures. Les animaux seront maintenus dans une anesthésie profonde tout au long de la procédure avec en complément l'injection d'un antidouleur et seront mis à mort par surdose d'anesthésique sans s'être réveillés.

Avantages : les étudiants pourront mettre en pratique les différents moyens mis à leur disposition pour évaluer la profondeur de l'anesthésie et l'entretien d'un anesthésie chirurgicale, pour la préparation d'un champ stérile, le travail de manière aseptique, la réalisation d'une procédure chirurgicale tout en contrôlant en permanence la qualité et la profondeur de l'anesthésie.

Dommages escomptés. Les animaux subiront d'abord la procédure de l'anesthésie et pourront se réveiller. La procédure chirurgicale sera réalisée chez ces mêmes animaux le lendemain et l'anesthésie nécessaire à la procédure sera maintenue jusqu'à l'euthanasie des animaux par surdosage d'anesthésique. Des points limites seront utilisés à l'aide de grilles de score pour déterminer l'injection d'antalgiques ou la sortie de procédure.

L'ensemble des procédures seront réalisées sous le contrôle d'enseignants possédant une formation concepteur et/ou applicateur et ayant validé une formation réglementaire à la chirurgie et sous contrôle vétérinaire.

Types d'animaux. Les animaux utilisés seront des souris issues de l'animalerie de la faculté et qui sont normalement vouées à être mises à mort car arrivées en fin de procédures ou/et animaux issus d'élevage mais non inclus dans des procédures.

Le projet impliquera au maximum 180 souris sur 5 ans.

**8639** Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins pour tous.

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

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer de la sécurité et des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés pour ce type d'étude étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 2900 rats, 2500 lapins, 80 cobayes, 200 ovins, 200 porcins, 100 caprins, et 100 chiens.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période post-opératoire. Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes, les chiens et les porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

**8640** Les stents actifs de première génération n'ont pas démontré de diminution de la morbi-mortalité au long cours, comparativement aux stents nus, du fait d'un risque accru de thrombose aigue tardive. Actuellement, ils imposent le recours à une double anti-agrégation au long cours, souvent délétère. Ce risque s'explique par un retard de cicatrisation et de ré-endothélialisation des mailles, entraînés par les drogues utilisées, et des phénomènes d'hypersensibilité liés aux polymères non résorbables délivrant ces drogues.

Des travaux ont été déjà conduits sur deux molécules thérapeutiques (l'hémine et un nouvel anti-thrombotique) chez l'animal (administrées par voie générale), avec lesquelles une diminution significative de la resténose a été démontré in vivo, tout en améliorant la cicatrisation et la ré-endothélialisation.

L'hypothèse fondant ce travail est que la fixation directe des molécules sur la surface du stent par chargement d'un polymère biodégradable et puis l'administration locale, permettrait de diminuer considérablement les phénomènes de resténose et le risque de thrombose aigue tardive.

C'est ce qui fait l'objet de ce projet : utiliser les modèles établis de resténose chez le rat (Wistar, male, c.a. 400 g) et le lapin (New Zealand White, male, c.a. 3,5 Kg) comme model pour évaluer les cibles et les stratégies de prévention de la resténose, par ces stents « actifs » dessus.

Tous les efforts ont été faits pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés et pour affiner les expériences à leur causer le moins de douleurs et de détresse possible.

Replace :

Bien que les résultats obtenus par les travaux déjà conduit soient très prometteurs, la réalisation de test in vivo est indispensable pour évaluer les différents éléments suscités en situation réelle ressemble à un patient humain. Ils nous ont permis de sélectionner la meilleure molécule active, dont réduisant ainsi au maximum l'utilisation des animaux.

Refine :

1. Toutes les procédures seront effectuées sur des rats ou lapins anesthésiés ayant reçu une analgésie préopératoire, ne provoquant ainsi aucune douleur. Tout au long de la procédure chirurgicale, les animaux seront sous isoflurane sur plaque chauffante (rats). Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique, antibiotique (lapin), et un régime normal ad libitum.

2. Au cours de l'étude, les animaux seront observés et surveillés de près chaque jour à l'égard de leur bien-être et de leurs conditions optimales de cicatrisation et de récupération. En cas d'inévitable nécessité, la décision d'euthanasie de l'animal sera prise et réalisée avant que les animaux ne souffrent.

Reduce :

En référence aux publications antérieures, un minimum de 10 animaux par groupe sera nécessaire et suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ( $\alpha=80\%$ ,  $p=0.05$ ).

Chez le rat, lorsque 2 nouveaux stents actifs seront à même temps, un même lot de rat sera utilisé afin limiter le nombre d'animaux témoins ; chez le lapin, l'étude ne sera réalisée qu'avec les nouveaux stents actifs ayant démontré un effet bénéfique chez le rat afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet sera 360 rats et 80 lapins.

**8641** La prise alimentaire repose sur l'intégration de signaux métaboliques et hormonaux mais aussi de signaux sensoriels, principalement olfactifs permettant de déclencher la prise d'aliments en situation de faim et de l'inhiber en situation de satiété. Cependant, outre cette facette homéostatique du comportement alimentaire, il existe aussi une facette hédonique. Ainsi, l'odeur d'aliments très appétitifs (généralement gras et sucrés) peut déclencher l'envie de consommer ces aliments, même quand l'individu n'est pas en état de faim. Ce phénomène pourrait induire une hyperphagie et mener progressivement à des désordres métaboliques et à l'obésité. A ce jour, les mécanismes qui sous-tendent ce processus restent à explorer.

Notre objectif est donc d'examiner les régions cérébrales impliquées dans la réactivité de l'individu vis-à-vis d'une odeur chocolatée, à forte valeur hédonique, en utilisant une approche d'imagerie cellulaire permettant d'évaluer l'activation neuronale. Nous nous focaliserons en particulier sur les neurones orexinergiques de l'hypothalamus car des travaux préliminaires suggèrent qu'ils seraient mis en jeu dans des situations d'éveil comportemental.

Les données obtenues chez la souris permettront aussi de mieux comprendre les mécanismes nerveux impliqués dans l'hyperphagie engendrée par les odeurs d'aliments fortement palatables.

La règle des trois R est prise en compte dans notre projet :

-Nos investigations, visant à corréliser la réactivité comportementale olfactive avec l'activation neuronale présentent un caractère invasif, et ne peuvent donc être envisagées que sur un modèle animal. Notre choix s'est porté sur la souris il existe une vaste littérature sur l'utilisation de ce modèle pour étudier le comportement alimentaire et nous bénéficions de données préliminaires. De ce fait, les données que nous obtiendrons viendront directement s'insérer dans les connaissances antérieures et permettront plus facilement une extrapolation ultérieure à l'Homme.

- Les effectifs de souris envisagés dans notre étude (30 animaux) sont limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures.

-Notre protocole prend en compte le bien-être animal et tout est mis en œuvre pour minimiser un éventuel stress, car ce dernier pourrait impacter le comportement des animaux et biaiser nos résultats. Notre approche a donc été optimisée au travers d'une recherche bibliographique aboutie et des discussions avec le personnel animalier.

**8642** Ce projet innovant vise à découvrir de nouveaux rôles d'une protéine clé impliquée dans l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (MA). On sait que les patients atteints de la MA ont une incidence accrue de convulsions épileptiques. Au cours de la dernière décennie, on a suggéré un déséquilibre des systèmes de communication entre les neurones du cerveau. Cette perturbation de l'activité du réseau peut causer de l'épilepsie et peut être une cause de déclin cognitif dans la MA. La protéine SV2A a été associée à la physiopathologie de l'épilepsie et a été une cible moléculaire de médicaments antiépileptiques. SV2A, de par sa localisation, participerait à la communication entre les cellules nerveuses. Nous chercherons quel rôle peut jouer SV2A dans la neurotransmission. Nous postulons que le dérèglement des fonctions de SV2A dans la neurotransmission peut aussi participer à la pathologie de la MA. Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de SV2A dans l'orientation épileptique de la maladie et, en fin de compte, à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'épilepsie et de la MA. La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (tranches de cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous supprimerons le gène encodant la protéine SV2A dans les neurones étudiés avant d'analyser si la communication entre les neurones est perturbée par l'absence de SV2A. Ces modifications génétiques seront réalisées grâce à l'utilisation de ciseaux moléculaires injectés dans les neurones du cerveau afin d'enlever ou de remplacer le gène encodant pour SV2A. Ces injections cérébrales auront lieu sur des souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxique ». Nous utiliserons la lignée de souris SV2A<sup>Koc</sup> qui n'a pas de phénotype dommageable. Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique permettra d'injecter des souris qui seront par la suite utilisées au cours d'expériences d'enregistrement de l'activité des neurones (électrophysiologie) ou d'expériences d'imagerie cellulaire et moléculaire.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

(1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie ou d'imagerie afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (réduction). (2) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés (raffinement). (3) Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein de réseau de neurones. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère dont le génome est facilement modifiable.

780 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension de l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer.

**8643** La nanotechnologie est en plein essor industriel depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle. Les propriétés exceptionnelles et innovantes des nanoparticules (NP), acquises par leur taille nanométrique, les rendent en effet très intéressantes pour l'industrie. Ainsi, on retrouve les NP dans différents domaines

d'application comme la médecine, l'industrie cosmétique, les secteurs agroalimentaires et électroniques.

Cependant, et malgré les bénéfices importants que les NP apportent, leur utilisation exponentielle lors de ces dernières années suscite des inquiétudes quant à leurs potentiels effets sur la santé de l'Homme et sur l'environnement. De plus, il est déjà bien connu que les polluants atmosphériques, incluant les particules ultrafines, peuvent avoir des effets néfastes sur la santé, en particulier au niveau pulmonaire. Les études toxicologiques des nanomatériaux sont donc nécessaires pour connaître le risque de leur utilisation. Des études ont en effet montré qu'une exposition à des NP pouvaient induire un remodelage pulmonaire (comme la fibrose) et cela était associé à des réponses biologiques (notamment la réponse inflammatoire et le stress oxydant).

Les effets toxiques des NP démontrés *in vivo* ont incité les chercheurs à s'interroger sur les risques potentiels d'une exposition pendant la gestation, période de grande susceptibilité aux molécules exogènes. Des études ont montré que l'exposition de souris gestantes à diverses NP manufacturées est associée à des hypotrophies fœtales, une neurotoxicité, et une atteinte rénale chez la progéniture. Ces résultats ont toutefois été le plus souvent obtenus après exposition maternelle aux NP par voie intraveineuse ou sous-cutanée, et rarement par voie respiratoire. Les NP manufacturées pourraient interagir avec le développement pulmonaire normal du fœtus. Ceci est suggéré par la récente démonstration que l'exposition de souriceaux nouveau-nés à des NP de dioxyde de titane par instillation intranasale est associée à une inflammation pulmonaire et une altération du développement pulmonaire. Mesurer les conséquences d'une exposition par voie respiratoire à des NP manufacturées sur le développement respiratoire de la descendance est important. En effet, il est connu que l'exposition *in utero* à des facteurs environnementaux, comme le tabagisme maternel, est susceptible d'altérer le développement fœtal des voies aériennes et/ou du poumon distal, mesurables par une augmentation de la morbidité respiratoire postnatale et une détérioration définitive des fonctions respiratoires. Si de telles altérations sont observées après exposition aux NP, elles pourraient constituer un facteur de susceptibilité important aux maladies respiratoires chroniques de l'adulte. Une récente étude *in vivo* a de plus montré que suite à une exposition de lapines gestantes à des NP de la pollution atmosphérique (diesel) par voie pulmonaire, des effets sur la descendance (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération) ont été observés, ces altérations étant associées à des anomalies placentaires (diminution de l'efficacité placentaire et diminution du flux vasculaire placentaire).

Une étude menée dans notre laboratoire a montré, que l'exposition pulmonaire à forte concentration de NP pendant la gestation induisait une altération du développement pulmonaire de la descendance quelle que soit la nature chimique de la NP utilisée. Cette présente demande d'autorisation de projet s'inscrit dans la continuité d'une précédente demande.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets d'une exposition pulmonaire de souris femelles gestantes à différentes NP, à différentes doses, sur le développement pulmonaire de la descendance de la première et la deuxième génération. L'étude dose-réponse va permettre ainsi de déterminer à partir de quel niveau de dose une exposition non-intentionnelle de NP pendant la gestation est associée à un risque pour la santé de la descendance. De plus, afin de mesurer la susceptibilité pulmonaire de la descendance à un autre toxique exogène, un groupe de souris exposé par voie respiratoire pendant la gestation aux NP, sera exposé à la fumée de cigarette (pour le modèle de bronchopneumopathie chronique obstructive), un autre groupe de souris exposé par voie respiratoire pendant la gestation aux NP, sera exposé à la bléomycine (pour le modèle de fibrose pulmonaire). Dans ces deux procédures, des prélèvements pulmonaires en vue des analyses biologiques et histologiques seront réalisés. Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 820 souris au total par NP étudiée. Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, ainsi les animaux présentant un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer.) seront euthanasiés après anesthésie à l'isoflurane. Afin d'enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

**8644** Pour anticiper l'interdiction en 2015 du bisphénol A (BPA) dans tous les conditionnements alimentaires, les industriels ont progressivement substitué le BPA par un autre bisphénol possédant

des propriétés physicochimiques similaires au BPA, le bisphénol S (BPS). Le BPS est utilisé pour la fabrication de biberons, de vaisselles pour enfants et en tant que révélateur dans les papiers thermiques. Le BPS est actuellement présent dans 100 % des poussières d'intérieur en Amérique du Nord et dans 81 % des échantillons d'urine de la population générale en Asie et aux Etats Unis.

En outre, le BPS est plus persistant dans l'environnement que les autres bisphénols. Cette prévalence élevée de l'exposition humaine au BPS est préoccupante en raison de ses capacités à perturber le système hormonal. En effet, des études expérimentales chez les rongeurs et dans des modèles in vitro ont mis en évidence des effets adverses sur la fonction de reproduction et sur le développement.

A ce jour, les données toxicologiques concernant l'exposition du fœtus ou du nourrisson au BPS sont inexistantes. Ainsi, pour ne pas reproduire la « saga » du bisphénol A, il est critique d'évaluer le risque lié à l'exposition fœtale humaine au bisphénol S qui est déterminée par un ensemble de facteurs physiologiques.

Nous avons précédemment développé le modèle du fœtus ovin instrumenté. Ce modèle animal consiste en un fœtus ovin au dernier tiers de gestation dont les vaisseaux sanguins sont cathétérisés au cours d'une intervention chirurgicale pour permettre de réaliser des administrations intraveineuses et des prélèvements sanguins répétés sur une période de plusieurs semaines. L'intérêt de ce modèle est qu'il autorise la réalisation de prélèvements sanguins répétés du côté fœtal et du côté maternel. Ce qui permet de réduire le nombre d'animaux dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors qu'un modèle classique rongeurs ne peut être prélevé qu'une seule fois.

Ce modèle a été choisi en raison de sa pertinence vis-à-vis de l'homme en termes de physiologie fœtale. Il permet de prendre en compte l'ensemble des facteurs physiologiques impliqués dans l'exposition fœtale au BPS, ce qui n'est pas réalisable avec une étude in vitro. Le nombre d'individus (15) correspond au nombre minimum qui permet d'assurer la reproductibilité des mesures et la robustesse des paramètres estimés.

Afin de respecter le bien-être animal, les animaux, placés dans un box individuel après la chirurgie, ont un contact visuel avec leurs congénères de façon à limiter l'impact de leur isolement.

Concernant la gestion de la douleur, une prémédication est réalisée avant la chirurgie afin de limiter la douleur, le stress et le risque d'infection. Un protocole d'anesthésie générale et de gestion de la douleur adapté est appliqué lors de la chirurgie et les constantes physiologiques sont suivies à l'aide d'un appareillage de monitoring cardio-respiratoire. Un examen clinique quotidien est réalisé après la chirurgie par un vétérinaire référent et en cas de diminution constatée de l'appétit et/ou de modification du comportement (diminution de la rumination), une administration d'anti-douleurs est réalisée.

**8645** La tuberculose humaine demeure un enjeu majeur de santé publique. Encore de nos jours, des millions d'humains sont touchés par cette maladie. Au sein de notre unité de recherche, nous nous intéressons à l'identification et à la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires caractérisant la bactérie parasite responsable de cette maladie : *Mycobacterium tuberculosis*. Ces informations peuvent s'avérer très importantes pour le développement de nouveaux outils préventifs, diagnostiques et thérapeutiques afin de combattre la tuberculose.

Pour cette recherche, l'expérimentation animale via des infections par aérosol reste indispensable et demeure le seul moyen pour étudier l'effet du pathogène sur un organisme entier. Dans ce cadre, le cobaye apparaît être un modèle de choix. Une infection par aérosol chez cet animal montre de grandes similarités avec des infections naturelles chez l'homme et surtout a pour conséquence le développement d'une pathologie comparable à celle caractérisée chez l'homme.

Lors de nos études in vitro, nous montrons le rôle potentiel de protéines dans la virulence, nous modifions ensuite des bacilles tuberculeux pour pouvoir mieux comprendre leur rôle et confirmons leur implication en comparant la virulence de souche modifiée ou non, in vitro puis in vivo. Parce qu'une expérience d'infection par aérosol sur modèle cobaye est complexe dans sa mise en œuvre, mais aussi dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, seules des souches ayant montré des résultats convaincants in vitro puis sur le modèle souris y seront testées. A ce sujet, la souris demeure un modèle pertinent, notamment dans l'étude de la réponse immunitaire à l'infection, mais présente néanmoins un tableau clinique moins fidèle à celui de l'homme. Elle continue de jouer

un rôle essentiel dans le criblage et la sélection de souches, molécules, vaccins avant leurs essais sur des modèles plus grands. Succinctement, une expérience repose sur deux grandes étapes : l'infection par aérosol puis l'euthanasie des animaux entre 4 et 8 semaines post-infection avec prélèvement des poumons et de la rate pour dénombrer le nombre d'unités formant colonies (UFC). Ces dénombrements et leur comparaison entre les différentes souches testées permettront de statuer sur la virulence des souches et de confirmer ou non le rôle des protéines étudiées. Une étude avec infection par aérosol peut comprendre jusqu'à 4 groupes expérimentaux (donc 4 souches différentes), chacun comprenant 8 animaux : 2 sont mis à mort au jour 1 post-infection pour contrôler la dose d'infection et les 6 autres à 6 ou 8 semaines pour déterminer la virulence des souches sur la base des UFC présentes dans les organes. Le nombre de cobayes pour une expérience est au maximum de 32 animaux.

De par notre implication dans un important projet collaboratif engagé dans l'optimisation des essais pré-cliniques pour le développement de nouvelles molécules anti-tuberculeuses, nous sommes également amenés à utiliser ce modèle pour éprouver l'efficacité bactéricide in vivo de ces molécules. Ce projet a pour ambition d'établir une nouvelle méthodologie normalisée, basée sur des combinaisons d'approches in vitro et in vivo, qui permettra à terme une détection plus optimale, précise et rapide de nouveaux médicaments prometteurs dans la lutte contre la tuberculose. Une confiance accrue dans la prédiction de leur efficacité aura un bénéfice considérable pour les essais cliniques, notamment ceux concernant les nouvelles molécules anti-tuberculeuses en cours de développement. Notre participation à ce projet permet de générer in vivo des données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez le cobayes qui participeront donc à l'optimisation et au développement de nouveaux médicaments anti-tuberculeux. Concrètement, l'expérience repose à nouveau sur une infection par voie aérosol des animaux, suivie d'une phase de 4 semaines sans manipulation, pour permettre la réplication et la colonisation des organes par le pathogène, à la fin de laquelle débutera une phase de traitement de 4 semaines. Chaque groupe expérimental (correspondant à un médicament ou combinaison de médicaments) comprend 8 animaux : 2 sont mis à mort chaque semaine et leurs organes prélevés pour dénombrer les UFC et ainsi estimer l'efficacité du traitement au cours du temps. Si on y ajoute les animaux « contrôles », le nombre total de cobayes requis pour une expérience est de 28.

Nous prévoyons de mener au cours des 5 prochaines années, une dizaine d'études « virulence » (Procédure expérimentale No. 1) et les 2 études « traitement » (Procédure expérimentale No. 2) nécessaires au projet collaboratif (auxquelles il nous faut ajouter 8 cobayes pour estimer la concentration optimale des nouvelles molécules à administrer), soit 384 animaux requis pour la mise en œuvre de cette demande. Les procédures que nous mettrons en œuvre le seront dans le contexte des deux valences – réduction et raffinement – de la démarche 3R. Seul le minimum d'animaux nécessaire à l'obtention de données statiquement robustes sera utilisé. Un suivi strict des animaux sera opéré tout au long de l'expérience via une observation régulière pour détecter tout changement physique ou comportemental et via une pesée hebdomadaire. Les animaux étant mis à mort avant un décès potentiel du à l'infection, le niveau de sévérité est ici considéré comme modéré.

**8646** L'obésité et le diabète de type 2 sont des pathologies métaboliques humaines en pleine expansion et il est important d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de proposer des solutions thérapeutiques efficaces. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin d'avoir un modèle murin intégré qui permet d'étudier le métabolisme et ses altérations.

Au cours de ces dernières années, il a été identifié un nouveau rôle des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) (points de contact appelés MAMs) dans le contrôle de l'action de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique, et un défaut de communication entre les deux organites a été mis en évidence en situation d'insulino-résistance dans différents modèles murins d'obésité et de diabète de type 2 (DT2). Il est donc important maintenant de déterminer 1) si altérer les MAMs est suffisant pour altérer in vivo la sensibilité à l'insuline, et 2) si restaurer l'intégrité des MAMs pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique pour améliorer la sensibilité à l'insuline hépatique et musculaire et in fine l'homéostasie glucidique. Des données préliminaires in vitro et ex-vivo suggèrent un effet bénéfique de la modulation des MAMs sur la signalisation et l'action de l'insuline, qu'il nous faut maintenant confirmer in vivo.



Par conséquent, l'objectif original de ce projet est de moduler positivement et négativement les interactions mitochondries-RE dans le foie ou le muscle squelettique de souris, en surexprimant différentes protéines spécifiques des MAMs ou un linker moléculaire à l'aide d'adénovirus non réplicatifs, et de mesurer les répercussions sur la structure et fonction des deux organites et sur la sensibilité à l'insuline de chaque tissu. Ces modulations géniques seront faites systématiquement dans le foie et potentiellement dans le muscle squelettique (si les résultats dans le foie sont positifs) sur différents modèles de souris, chacun correspondant à une procédure expérimentale différente dans cette demande : i) des C57Bl/6 saines, ii) un modèle génétique de souris obèses et diabétiques (souris ob/ob), iii) un modèle nutritionnel d'obésité et de DT2, les souris nourries par une diète riche en lipides et en sucrose (HFHSD), et iv) un modèle génétique d'altération des MAMs, la souris cyclophiline D-KO).

Pour chaque protéine qu'on souhaite moduler dans un modèle murin donné, nous avons besoin de 50 souris (25 souris Ad-GFP utilisées comme contrôles et 25 souris Ad-protéine cible) pour réaliser l'ensemble des analyses prévues. Un réplicat d'expérience est éventuellement prévu pour compléter les analyses si besoin. Nous prévoyons dans les 5 ans de moduler l'expression de 5 protéines d'intérêt différentes (3 actuellement connues et 2 supplémentaires en fonction des résultats à venir) dans le foie et/ou le muscle squelettique, dans un ou plusieurs des modèles proposés en fonction de l'évolution de nos résultats. Ce projet correspond donc à un protocole séquentiel qui sera amené à son terme que si les étapes initiales sont validées et qui utilisera donc à minima 650 souris et au maximum 2450 souris, suivant les tissus (foie et/ou muscle) et modèles murins ciblés et en fonction de la nécessité de faire un réplicat ou pas. Ce chiffre a été estimé à minima pour satisfaire les analyses statistiques et réaliser l'ensemble des analyses. En accord avec la règle des 3R, les souris seront surveillées tous les 2 jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Chaque souris sera suivie individuellement afin de collecter un maximum de données biologiques et ainsi limiter la quantité de souris au nombre minimum pour assurer des analyses statistiques fiables et interprétables.

**8647** L'hypothèse de la programmation précoce des maladies de l'adulte souligne l'importance de la période périnatale comme fenêtre critique hautement sensible aux facteurs environnementaux. A ce titre, les études épidémiologiques soulignent que l'adversité précoce constitue un facteur de risque majeur pour la santé future. Des données croissantes suggèrent que des altérations précoces de l'axe intestin-cerveau et du microbiote intestinal acquis à la naissance (« primobiote ») puissent participer à cette vulnérabilité. En effet, la période périnatale est une fenêtre de temps critique pour l'établissement d'une relation de mutualisme entre barrière intestinale, microbiote et cerveau. Des perturbations de la maturation du microbiote intestinal induites par des stress précoces divers (antibiotiques, infection, stress psychosocial...) altèrent à long terme l'homéostasie intestinale, le cerveau et les processus émotionnels et cognitifs. Des stratégies nutritionnelles périnatales ciblant le microbiote pourraient constituer des cibles privilégiées afin de protéger les sphères digestives et cérébrales des effets délétères du stress précoce. Ainsi, dans des modèles animaux, des données récentes indiquent que des prébiotiques, tels que oligosaccharides du lait, administrés à l'âge adulte atténuent les effets de stress chroniques sur la composition du microbiote, les comportements émotionnels et la plasticité cérébrale.

Notre projet s'inscrit dans la recherche de stratégies nutritionnelles pour améliorer le bien-être et la santé du nourrisson exposés au stress lors du développement. Etant donné la difficulté des études prospectives chez l'homme, l'utilisation de modèles animaux s'avère indispensable pour comprendre le rôle des stress néonataux et les effets de la nutrition sur le cerveau et les comportements à long terme.

Nous étudierons l'impact d'oligosaccharides du lait administrés en période néonatale sur la composition du microbiote intestinal et ses répercussions sur les atteintes intestinales, neurodéveloppementales et comportementales associées au stress précoce. Nous utiliserons le stress de séparation maternelle chez le rat comme proxy de l'adversité psychosociale précoce.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 157 rats sur une durée d'un an. La règle des 3rs sera respectée dans ce projet. L'étude de comportements anxio-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre

d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles (analgésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

**8648** Suite à des études menées chez la souris et confirmées chez l'homme, il est aujourd'hui clairement admis que l'inflammation chronique générée par la réaction des lymphocytes contre les bactéries qui composent la flore commensale de l'organisme (microbiote) favorise le développement de cancers. Ainsi, améliorer nos connaissances sur les mécanismes qui contrôlent la réaction des lymphocytes contre le microbiote semble essentiel à l'établissement de nouveaux traitements anti-cancéreux. Depuis de nombreuses années, le Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) apparaît comme une protéine majeure dans le contrôle des lymphocytes. Nos observations chez la souris ont révélé qu'en l'absence de contrôle des lymphocytes par le TGF-beta, les animaux développent spontanément des cancers ou des transformations cellulaires dans des régions en contact avec le microbiote (peau et intestin).

L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle du TGF-beta dans le contrôle de la réponse des lymphocytes contre le microbiote et ses conséquences directes sur le développement de cancers cutanés. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant les premiers mécanismes responsables du cancer suite à l'activation des lymphocytes par le microbiote, qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers l'utilisation d'antibiotiques ciblés comme agents thérapeutiques d'une inflammation à l'origine de cancers. La réponse aux questions scientifiques posées implique le maintien d'une étude physiopathologique constante du fait de l'interaction de trois systèmes complexes que sont le microbiote, le système immunitaire et l'organe cible. Seul des études chez la souris, modèle où les réactifs sont adaptés et la caractérisation du microbiote est bien décrite, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques. Des groupes de 5 à 7 animaux adultes d'âges similaires et un duplicata des expériences princeps assortis aux études statistiques et à des groupes contrôles communs à différentes lignées de souris seront mis en place afin d'obtenir avec un faible effectif la réponse aux questions posées. En plus des observations quotidiennes faites par les chercheurs une observation régulière des animaux par les responsables bien-être sera réalisée. Pour ce projet, 232 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans.

**8649** De nombreuses études ont mis en évidence le fait que l'état psychique de la femme enceinte joue un rôle essentiel dans le devenir de l'enfant. Ainsi, il a été montré chez l'homme qu'un stress in utero pouvait engendrer des changements neuro-développementaux, comportementaux et cognitifs importants chez l'enfant, se manifestant notamment par des troubles de l'attention, par une augmentation des niveaux d'anxiété et par une déficience cognitive pouvant affecter la réussite scolaire. Ces études, par nature rétrospectives, ont été modélisées chez l'animal et notamment le rongeur. Grâce à ce modèle, de nombreuses études comportementales ont pu mettre en évidence que l'exposition de souris à un stress prénatal engendre des déficits comportementaux tels qu'une diminution des interactions sociales, une anxiété accrue et une altération de la mémoire spatiale. Sur cette base notre projet depuis plusieurs années vise à analyser les mécanismes à l'origine de ces altérations comportementales. Nous nous sommes concentrés sur une structure clé impliquée dans les processus mnésiques et les états émotionnels, l'hippocampe, et en particulier sur le gyrus denté (GD). Cette région cérébrale présente une plasticité importante liée à un développement continu qui s'étend de la période prénatale à l'âge adulte. Elle est donc capable d'intégrer, de façon constitutive, une fraction non négligeable de nouveaux neurones. L'objectif de ce projet sera donc d'étudier l'impact du stress prénatal sur le développement de la morphologie et de la connectivité des neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe générés à différents stades de vie (embryonnaire, néonatal, juvénile et adulte). Compte tenu de la pertinence de ces éléments comme unité synaptique fonctionnelle requise pour le stockage de la mémoire, cette analyse pourrait avoir des conséquences importantes pour la prévention et le traitement des altérations cognitives qui résultent du stress prénatal.

Cette étude sera menée sur des souris de différents âges permettant d'étudier la dynamique de développement des neurones granulaires générés en période embryonnaire, néonatale, juvénile, et adulte. La moitié des animaux aura été soumise à un stress in utero réalisé à travers des sessions de stress appliquées aux femelles gestantes afin de reproduire la situation observée chez l'homme. Pour étudier les neurones, nous mettrons en œuvre des approches chirurgicales afin d'injecter des préparations permettant de visualiser les neurones granulaires et leurs connexions. Après intégration de ces préparations dans la structure d'intérêt, une étude anatomique sera réalisée. Nous estimons le nombre maximal d'animaux nécessaires à 1195 souris.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous avons défini un nombre maximum de souris par groupe qui correspond au nombre minimal nécessaire et suffisant pour faire des analyses statistiques cohérentes. Nous avons aussi décidé de faire appel à une experte dans la réalisation des procédures chirurgicales sur l'embryon et le nouveau né, garantissant ainsi la réussite de ces procédures et donc une réduction du nombre d'animaux nécessaires. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles in vitro.

**8650** La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour pallier au dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant, en absence de traitement, le greffon est rejeté par le système immunitaire de l'hôte. Aujourd'hui, l'utilisation d'immunosuppresseurs pharmacologiques permet de retarder ce rejet mais ne permet pas de le contrôler. De plus, ces drogues entraînent des effets secondaires importants. C'est pourquoi la recherche en transplantation vise à trouver des traitements alternatifs à ces immunosuppresseurs. Une des stratégies les plus prometteuses consiste à injecter au receveur des cellules protectrices du greffon, on parle alors de thérapie cellulaire.

Au sein de notre unité, nous travaillons sur des protocoles de thérapie cellulaire permettant la survie du greffon à l'aide de modèles de greffes chez l'animal. Notre équipe a plus particulièrement montré l'efficacité d'une population de cellules immunorégulatrices appelée ATDC (Autologous Tolerogenic Dendritic Cells) dans plusieurs modèles de transplantation chez le rongeur. Ces cellules expriment fortement le récepteur à la fractalkine (CX3CR1), comparé à d'autre population de cellules myéloïdes. Or dans la littérature, cette molécule est associée à des propriétés tolérogènes. En effet, une surexpression de cette molécule a été observée dans des greffons de cœur tolérés chez le rat. De plus, l'injection de phagocytes mononuclés intestinaux CX3CR1<sup>high</sup> permet de protéger des souris de l'induction de la colite. Ces éléments nous amènent à penser que la molécule CX3CR1 a un rôle clef dans l'effet tolérogène des ATDC en transplantation.

Le but de ce projet est d'étudier si en absence du récepteur à la fractalkine, les ATDC conservent ou non leur effet tolérogène vis-à-vis d'une greffe de peau chez la souris.

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

-Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée chez l'homme sans résultats préalables. Les études in vitro permettent de tester l'efficacité des cellules sur certains types de cellules suite à des stimulations artificielles. Cependant, la réponse immune suite à une allogreffe est complexe (plusieurs types cellulaires impliqués, plusieurs organes) et ne peut être mimée in vitro. De plus, la migration préférentielle dans certains tissus, ainsi que les modifications subies par les cellules suite à leur injection n'est pas analysable in vitro. Cette étude nécessite donc l'utilisation d'un organisme entier, vivant et greffé. La nature de ce projet ne permet donc pas de s'affranchir de l'utilisation d'animaux.

-Réduire : le nombre d'animaux a été réduit à 624 souris (d'après le point 6.4.10), nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé. De plus, des scores seront établis pour évaluer le rejet des greffons. Nos études

précédentes indiquent que la greffe de peau ou le traitement avec les ATDCs n'entraîne pas de perte de poids des animaux. Cependant, si des animaux atteignent une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé, ceux-ci seront mis à mort, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (coton de nidation) est placé dans les cages. Durant le protocole, une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée. Les animaux traités avec les ATDC et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'obtenir un maximum d'information post mortem : par immunohistologie pour le greffon, ainsi que d'autres organes pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer l'importance de la molécule CX3CR1 dans l'efficacité tolérogénique des ATDC en transplantation.

#### **8651** 1-Objectif scientifique du projet

Notre laboratoire a montré que les protéines Y et Z sont surexprimées dans certains types tumoraux. Le couple protéine Y-Z/récepteurs appartient à une famille de récepteurs membranaires.

Le but de ce projet est de « capturer » le ligand pour induire la mort des cellules cancéreuses en combinaison avec la réactivation du système immunitaire.

Pour ceci, des modèles de cancer dits syngéniques chez la souris, et présentant une forte expression des protéines Y et Z ainsi que la présence de ces récepteurs, seront utilisés.

Des anticorps anti-protéine Y et Z ont été développés par le laboratoire, les objectifs sont de :

- valider l'efficacité de ces anticorps thérapeutiques dirigés contre les molécules Y et Z
- optimiser les doses d'utilisation
- étudier les mécanismes ciblés par cette thérapie en combinaison avec d'autres molécules capables de réactiver une réponse immunitaire.

#### 2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Ces expériences permettront d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies en combinaison avec les nouvelles thérapies capables de réactiver la réponse immunitaire.

#### 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

L'établissement des différentes parties de ce protocole expérimental tient compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : 1) Les nouvelles thérapies utilisées dans cette étude ont déjà fait l'objet d'une validation in vitro qui nécessite d'être confirmée in vivo. Les souris immunocompétentes sont indispensables pour tester la réponse immunitaire 2) Les effectifs définis dans ce protocole ont été déterminés grâce au comportement connu de ces modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. 3) Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra un contrôle rigoureux de toute douleur animale.

#### 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Ce projet inclut 1600 souris.

#### **8652** 1-Objectif scientifique du projet

Notre laboratoire étudie les protéines de la famille Y. Nous avons montré que ces membres sont surexprimés dans certains types tumoraux mais leurs rôles dans le développement des organismes est encore mal décrit.

Le but de ce projet est de comprendre les différents rôles des membres de la famille Y à la fois lors du développement des organismes mais aussi chez l'animal adulte.

#### 2- Retombées attendues dans le domaine :

Ces expériences permettront de comprendre les mécanismes moléculaires et les compensations entre les membres de la famille qui interviennent à la fois lors des processus embryonnaires mais aussi chez la souris adulte.

#### 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

L'établissement des différentes parties de ce protocole expérimental tient compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : 1) Les membres de la famille Y ont déjà subi une validation in vitro pour déterminer les territoires d'expression des différents membres de la famille Y, qui nécessite d'être confirmée in vivo. Les souris sont indispensables pour tester les mécanismes

impliqués dans le développement embryonnaire et chez l'animal adulte 2) Les effectifs définis dans ce protocole ont été déterminés grâce au comportement connu de ces modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats. 3) Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra un suivi continu du bien être animal.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet :

400 souris sont nécessaires pour ce projet

**8653** La recherche sur le cancer est un enjeu majeur de notre société. En effet, cette pathologie est à l'origine de près de 150 000 décès par an en France.

Notre laboratoire a identifié un couple ligand/récepteur impliqué dans les phénomènes de cancérogenèse, notamment dans le contrôle de la mort cellulaire. Dans de très nombreux cas, on retrouve une dérégulation de ce couple ligand/récepteur empêchant ainsi la mort des cellules tumorales.

Depuis quelques années, il a été montré que les tumeurs sont hétérogènes. En effet, on retrouve des cellules avec des propriétés spécifiques. On retrouve notamment des cellules capables de redonner tous les types tumoraux, elles sont appelées cellules souche cancéreuses. Ces dernières sont décrites comme pouvant engendrer des métastases. D'autre part, on retrouve aussi des cellules non cancéreuses appartenant à l'environnement tumoral. Ces cellules auraient un rôle de support pour les cellules cancéreuses.

Le but de nos travaux est d'étudier l'effet de notre gène d'intérêt (codant le ligand) produit par l'environnement tumoral sur les cellules souches cancéreuses. Nos résultats préliminaires *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'expression du ligand est augmentée dans l'environnement tumoral. En effet, nous avons observé que les cellules non cancéreuses de l'environnement tumoral produisent le ligand en présence de cellules cancéreuses. Nos données *in vitro* suggèrent que cette expression du ligand favorise le développement de cellule souche cancéreuse.

Afin de tester si le ligand produit par l'environnement tumoral contrôle la production de cellules souches *in vivo*, nous allons utiliser un modèle murin transgénique permettant d'éliminer spécifiquement le ligand dans l'environnement tumoral. Pour cela, nous réaliserons des greffes de cellules tumorales (n'exprimant pas le ligand) chez des souris (i) exprimant ou (ii) invalidées pour notre ligand d'intérêt dans l'environnement tumoral. Puis, nous analyserons la croissance tumorale et le taux de prise tumorale (reflétant la présence de cellule souche).

De la sorte, nous pourrions déterminer si notre ligand produit par l'environnement participe à la croissance tumorale et au contrôle du caractère souche des cellules tumorales.

Le nombre de souris par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Une définition précise de points limites précoces et prédictifs et une surveillance adaptée des animaux (3 fois par sem. mesure de croissance tumorale, pesée) permet de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de l'animal. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux sont sortis de l'étude et mis à mort pour raison éthique. Nombre total de souris prévu : 560.

**8654** Le syndrome de Cohen (SC) est un syndrome rare caractérisé par l'association de nombreux déficits et malformations incluant le développement incomplet du cerveau, une obésité du tronc, des extrémités effilées, une hyperlaxité des ligaments, un retard psychomoteur, une insuffisance dans la production de certaines cellules immunitaires (sans conséquence infectieuse) et une perte progressive de la vision. Le SC est secondaire à des mutations du gène VPS13B. La fonction précise de la protéine VPS13B est peu comprise à l'heure actuelle. VPS13B se localise au niveau de l'appareil de Golgi, élément de la machinerie cellulaire nécessaire à la production des protéines. A la suite de mutations dans VPS13B les cellules des patients produisent des glycoprotéines (protéines liées à des sucres) anormales. Les sucres de ces protéines ne sont plus présents en quantité suffisante. Le lien entre VPS13B, ce défaut de glycosylation et les problèmes rencontrés chez les patients reste à comprendre.

Le but de ce projet est de comprendre l'implication de VPS13B dans la perte de vision et notamment son lien avec la dégénérescence des cellules de la rétine (les bâtonnets en particulier). Nous

souhaitons par l'étude du modèle murin, de souche C57/Bl6J inactivée pour le gène Vps13b (Vps13b<sup>-/-</sup>), déterminer ce rôle. Lors d'une précédente étude, nous avons pu mettre en évidence une mort des photorécepteurs similaire à celle observée chez les patients. Dans ce nouveau projet, nous souhaitons déterminer les voies moléculaires impliquées dans cette mort cellulaire.

Pour ce faire, dans une première procédure nous exposerons les souris Vps13b<sup>-/-</sup> à des intensités lumineuses plus intenses que les conditions d'hébergement standard afin de savoir si ce modèle est plus sensible à la toxicité lumineuse. Dans une deuxième procédure, il sera alimenté par un régime gras afin de savoir s'il est plus susceptible au dérèglement métabolique et à l'activation des voies moléculaires qui conduisent à la mort des photorécepteurs. Nous utiliserons des techniques d'imagerie in vivo et d'enregistrement de l'activité des neurones de la rétine qui sont aussi utilisées chez les patients afin de comparer les données. Les techniques d'imagerie et d'enregistrement in vivo seront effectuées en collaboration avec des experts dans le domaine, en utilisant leur matériel, protocoles et assistance afin que la procédure soit réalisée dans les meilleures conditions à la fois pour le bien être des animaux et pour la qualité des résultats obtenus.

La totalité de ce projet utilisera 544 souris sur une durée de 5 ans. Dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés pour plusieurs analyses (imagerie in vivo et électrophysiologie). Aussi, les souris Vps13b<sup>+/-</sup>, inactivées sur une seule des deux copies du gène Vps13b ne seront pas utilisées dans le projet car notre étude précédente a montré que leur rétine n'est pas affectée par le mécanisme présent chez les souris Vps13b<sup>-/-</sup>, ce qui limite donc le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Dans un but de raffinement, les protocoles utilisés pour les analyses seront effectués sous une même anesthésie afin d'éviter un trop grand nombre de manipulation ainsi qu'un stress et une souffrance supplémentaires aux animaux étudiés. Il est prévu de faire une analyse rétrospective des souris de cette lignée après chaque année afin de pouvoir déterminer précisément le degré de sévérité de leur phénotype du fait de la cécité liée à la cataracte bilatérale qui peut parfois (10% des cas) les affecter après 4 mois de vie sans toutefois s'accompagner de douleurs. De plus, afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux, si lors d'une analyse nous observons une cécité bilatérale alors l'animal sera euthanasié avant réveil. Nous testerons le remplacement de certaines études in vivo par la mise en place de cultures de rétines in vitro, sur lesquelles nous espérons pouvoir effectuer des analyses sans avoir à travailler sur des animaux vivants.

**8655** Chaque année, les cancers provoquent le décès de plusieurs dizaines de milliers de personnes. Jusqu'alors, les traitements classiques (chirurgie, chimiothérapie, rayons) ciblaient la tumeur elle-même, offrant de bonnes chances de survie à de nombreux malades présentant des cancers localisés, non encore disséminés dans l'organisme. En revanche, pour les malades porteurs de métastases, ces traitements ne sont pas assez efficaces. C'est pourquoi depuis peu, les chercheurs se penchent vers une nouvelle approche : l'immunothérapie. Cette approche permet de traiter le cancer en utilisant notre propre système immunitaire. Le principe de l'immunothérapie est « d'enseigner » à notre système immunitaire comment se défendre contre les cellules tumorales. Cette nouvelle approche qui peut être comparée à la vaccination, offre actuellement des résultats très prometteurs.

Le but de notre étude vise à mesurer expérimentalement l'efficacité d'une protéine recombinante (protéine R) en terme de capacité de protection contre une tumeur. Des données préliminaires obtenus in vitro, suggèrent que cette protéine R, possède un mécanisme d'action innovant qui lui permet d'agir comme un agent fortement immunostimulant.

Ce projet de recherche permettra de mieux comprendre les réponses immunitaires anti-tumorales induites avec la protéine R et d'évaluer les capacités thérapeutiques de cette protéine dans un contexte tumoral. L'idée principale est donc d'induire une réponse immunitaire grâce à l'injection d'une protéine recombinante R qui serait utilisée comme « auto-vaccination » contre les tumeurs.

La compréhension de l'organisation spatiale, et notamment le trafic cellulaire entre différents organes lors d'une vaccination et la génération d'une réponse anti-tumorale efficace est ici primordiale. C'est pourquoi, le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé.

Pour ce projet, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur,

souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux. Pour cela, les animaux seront hébergés par groupes expérimentaux de 5 souris dans des cages aux dimensions adaptées et dans des conditions de température, pression atmosphérique et ventilation contrôlée.

De même, afin de réduire la douleur les injections et mesures tumorales seront réalisées sous brève anesthésie à l'isoflurane (3% dans une chambre à oxygène).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 310 souris au maximum.

**8656** La maladie de Parkinson est une pathologie neurologique caractérisée par la manifestation de symptômes moteurs attribués à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DAergiques) de la substance noire pars compacta (SNc). Bien que ces symptômes sont bien étudiés et pris en charge par les traitements médicamenteux et chirurgicaux existants, la physiopathologie des symptômes non-moteurs, tels que la dépression, l'anxiété et la douleur, ne sont pas bien étudiées, et de ce fait ces symptômes sont mal pris en charge sur le plan thérapeutique.

Le but de ce travail est d'étudier les effets de la lésion des neurones dopaminergiques de la substance noire du mésencéphale sur les fonctions motrices et non-motrices ainsi que sur l'activité des neurones de trois structures cérébrales et de la moelle épinière impliquée dans ces différentes fonctions. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques de la maladie de Parkinson. L'objectif spécifique de l'étude vise à déterminer les modifications comportementales et électrophysiologiques de l'activité neuronale au sein de trois structures cérébrales et de la corne dorsale de la moelle épinière dans le but de comprendre la physiopathologie de ces symptômes.

Ce projet respecte la règle des 3R. Ainsi, pour le R de remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car cette étude nécessite une évaluation comportementale et aucun modèle in vitro ne peut reproduire les conditions de la pathologie étudiée.

Pour le R de réduire, nous limitons les groupes expérimentaux à un minimum acceptable statistiquement d'où le choix de 12 animaux par groupe. Ce nombre prend en compte l'erreur du repérage stéréotaxique de la structure cible qui dépend des variabilités inter-individuelles et au taux de déplétion dopaminergique fixé à un minimum de 70% pour l'inclusion des animaux dans cette étude.

Pour le R de raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaïne et buprenorphine) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie pour éviter toute souffrance des animaux avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement, des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux.

Cette étude sera réalisée sur 552 rats mâles adultes Sprague Dawley incluant l'ensemble des groupes expérimentaux et leurs contrôles sur une durée de 5 ans.

**8657** Les cellules NKT sont des lymphocytes de l'immunité innée connus pour leur rôle au cours des réponses anti-tumorales et antivirales. Ces cellules sont en effet capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales grâce à des récepteurs membranaires. Nous avons récemment mis en évidence le rôle de deux gènes appelés Myb et Zeb1 dont l'interaction semble essentielle au développement des cellules NKT dans le thymus des souris. Nous faisons l'hypothèse que le rôle de Myb est de réprimer l'expression de Zeb1 pour induire le développement des cellules NKT. Pour le tester, nous voudrions réaliser une souche de souris transgénique portant une mutation qui empêche la régulation de Zeb1 par Myb. Les interactions génétiques conduisant au développement de cellules NKT ne peuvent être récapitulées de façon satisfaisante in vitro en utilisant les modèles actuellement disponibles. Pour cette raison, le recours à des animaux transgéniques est obligatoire afin de répondre à notre question. Le phénotype attendu pour les animaux transgéniques comprend des problèmes d'oreille interne et d'obésité. Le nombre de souris sera donc réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 250. Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précis permettront de limiter au maximum toute souffrance animale.

**8658** La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées. L'une des thématiques de notre équipe est la réalisation de criblages génétiques sur modèles cellulaires afin d'identifier des gènes impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de la DMLA. CD63 est l'un de ces gènes et l'objectif de notre projet est de réaliser un phénotype rétinien aussi complet que possible de la souris knockout, ce qui nous permettra de vérifier si CD63 est impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de la DMLA. Un total de 400 souris sera utilisé pour réaliser ce projet sur une durée de 36 mois. La règle des 3R sera appliquée. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique (en tenant compte d'une perte possible de 10 à 20 % des souris en cours d'expérimentation). Raffiner : Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une maigreur anormale ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste l'importance de la protéine d'intérêt dans la physiopathologie de la DMLA. La démonstration d'un phénotype rétinien lié à l'absence de cette protéine permettrait de mieux comprendre la pathologie et la fonction des cellules rétiniennes.

**8659** Le cancer chez les enfants et les adolescents est un événement rare qui représente environ 1% de l'ensemble des cancers. Bien que rares, ils constituent la deuxième cause de mortalité entre 1 et 14 ans après les accidents et la première cause de décès par maladie pour cette tranche d'âge. Actuellement, les taux de guérison restent très faibles pour certaines formes de cancers avec moins de 10% pour les tumeurs cérébrales de haut grade et environ 30% des patients atteints de neuroblastome et sarcome d'Ewing restent en échec thérapeutique malgré des protocoles de radiothérapie et/ou de chimiothérapie à haute dose, qui peuvent être associés à une importante toxicité.

Le développement de modèles animaux de xénogreffes à partir du matériel tumoral issu des patients sans manipulation *in vitro*, est essentiel pour pouvoir proposer les modèles expérimentaux les plus adaptés et les mieux caractérisés pour comprendre le développement de ces maladies en échec thérapeutique. Les modèles pourront être utilisés pour tester de nouvelles molécules, identifier de nouvelles cibles ou marqueurs de réponse aux traitements, avec un transfert vers la clinique, au bénéfice direct des patients. La collecte du matériel biologique nécessaire, se fera en collaboration avec des services de chirurgie, de clinique, et d'anatomopathologie dans le respect de la réglementation en vigueur à ce jour (consentement éclairé, sérologies, anonymat). Il est prévu de collecter 20 tumeurs.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum, en pratiquant toutes les fois qu'il est possible des greffes bilatérales, sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. L'utilisation d'anesthésique, une définition précise des points limites, et une surveillance adaptée des animaux permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

Le nombre estimé de souris pour ce projet est de 350 sur une durée de 5 ans.

**8660** Les glioblastomes sont des cancers cérébraux qui restent de pronostic très défavorable malgré les progrès de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Le projet contribue à préparer un essai clinique d'un nouveau traitement du glioblastome de l'homme. Il s'agit d'un traitement de radiothérapie locale, par injection, dans la tumeur cérébrale, d'un composé radioactif encapsulé dans des particules de très petite taille (nanométrique). Avant de proposer le traitement innovant en essai clinique chez l'homme, plusieurs questions d'ordre scientifique et technique se posent encore et sont incontournables concernant ces radiopharmaceutiques. Un modèle gros animal tel que le chien est indispensable pour valider la technique, les modèles murins étant insuffisants du fait d'un problème



d'échelle (volume injecté, vitesse) et ne permettant pas d'essayer la technologie prévue pour l'homme (prototype d'injecteur automatique radio protégé). Nous souhaitons dans cette étude valider, sur un nombre restreint d'animaux (soit 6 chiens), ces aspects techniques d'administration du traitement et étudier la diffusion (bio distribution) du composé une fois injecté. La règle des 3R est respectée dans ce protocole car la preuve de concept technologique a déjà été validée sur chien euthanasié (Remplacement), nous utiliserons autant que faire se peut des animaux reproducteurs réformés ou des animaux de fin d'autres protocoles (Réduction). Enfin, les procédures seront effectuées en présence de professionnels de l'anesthésie, analgésie et du bien-être animal (Raffinement).

**8661** Dans ce projet nous voulons valider l'importance du rôle d'une protéine dans le cancer du colon dans la formation de tumeurs et analyser la capacité d'un anticorps dirigés contre cette protéine à réduire la formation de ces tumeurs. Pour cela, nous souhaitons utiliser des modèles de souris qui développent des tumeurs après injection de cellules tumorales humaines dans le flanc de la souris en sous cutanée. La croissance de la tumeur sera analysée par la mesure du volume de la tumeur au cours du temps.

Il n'y a pas de méthode alternative, en effet la formation de tumeurs est un phénomène complexe impossible à réaliser in vitro sur des cultures cellulaires.

Par cette étude, nous validerons l'utilisation d'un anticorps comme stratégie thérapeutique alternative dans le cancer du côlon.

Pour cette étude complexe nous avons prévu un nombre total maximal de 480 souris.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante.

Par ailleurs les souris disposent de copeaux de bois dans leurs cages afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement. Une surveillance quotidienne sera faite sur les souris en expérimentation afin de veiller au bien être des animaux.

Enfin ce modèle préclinique de tumeurs humaines chez la souris immunodéprimée est essentiel pour évaluer l'impact d'une protéine sur le développement tumoral

**8662** Le cytomégalovirus (CMV), quand il est transmis par la mère, peut provoquer des lésions graves sur le fœtus. Un pour cent des grossesses sont concernées. L'infection congénitale par le CMV est la première cause de retard mental et de surdité non génétique. La surdité peut apparaître plusieurs mois après l'infection, être de degré variable, évolutive et fluctuante. Les cellules souches du bulbe olfactif sont infectées chez le fœtus humain. Aucune donnée clinique n'est disponible concernant d'éventuelles atteintes de l'olfaction ni sur le retentissement dans les processus de mémorisation.

Notre hypothèse est que la mesure de la performance olfactive pourrait avoir un intérêt pronostique et donc aider à la prise en charge efficace des enfants infectés. Nous proposons une étude pré-clinique pour confirmer ou infirmer l'intérêt du développement de tests olfactifs pour des applications diagnostiques. Nous souhaitons explorer les atteintes olfactives dans un modèle murin d'infection congénitale au CMV. Si l'atteinte olfactive se calque sur les atteintes auditives et vestibulaires de cette maladie, l'atteinte pourrait être partielle, fluctuante, ou au contraire, complète. La mesure des capacités olfactives sera réalisée à l'aide d'olfactomètres. L'olfactomètre est un appareil qui distribue une récompense à la souris testée en fonction du comportement qu'elle adopte lorsqu'elle est exposée à une odeur, et qui enregistre ses performances. Les souris seront formées sur une série de problèmes de discrimination de deux odeurs. Le seuil de perception des odeurs, les capacités de discrimination et de mémorisation des odeurs seront évalués par différents tests comportementaux enregistrés par les olfactomètres. Les rochers, les épithélium olfactifs et les cerveaux seront ensuite prélevés puis analysés par immunohistochimie. La présence du CMV et de lésions éventuelles seront recherchées dans les systèmes auditifs et olfactifs.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire. Des modèles d'infection de cultures cellulaires existent mais elles ne rendent pas compte de la complexité de la propagation de l'infection dans le temps et dans l'organisme, ni des conséquences fonctionnelles sensorielles et cognitives, d'où la nécessité d'utiliser un modèle animal. Ce projet utilise le seul modèle expérimental murin permettant de suivre in vivo la transmission congénitale du CMV. Il comporte une seule procédure, de degré de sévérité modéré.

Nous respecterons la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) en limitant à 90 souris sur 3 ans le nombre d'animaux statistiquement utiles pour mener à bien ce projet. Les souris seront surveillées et entretenues dans un environnement contrôlé.

**8663** L'évolution des pratiques hospitalières a entraîné ces dernières années une augmentation de l'utilisation de matériel implanté chez les patients. Bien qu'améliorant la prise en charge et le confort des patients, ces matériels sont exposés au risque de colonisation par des micro-organismes pathogènes formant des biofilms particulièrement tolérants aux antibiotiques ainsi qu'aux défenses immunitaires de l'hôte. Ces biofilms augmentent donc le risque de survenue d'infections nosocomiales et il n'y a actuellement pas de méthode efficace pour le diagnostic prématuré, la prévention ou l'éradication des biofilms mis à part l'enlèvement ou le remplacement des dispositifs contaminés.

Ce protocole a pour objectif de pouvoir réaliser des expériences pertinentes permettant d'évaluer des approches thérapeutiques de ces infections liées aux matériels implantés. Les cathéters centraux à chambres implantables font partie des matériels utilisés régulièrement en clinique et sont des sources d'infection lorsqu'ils sont colonisés. Ce protocole vise la mise au point d'un modèle in vivo permettant de suivre le processus de développement de biofilm et de l'éradiquer. Il décrit la mise en place et la colonisation par des bactéries pathogènes chez le rat d'une chambre implantable dont le cathéter sera inséré dans la veine jugulaire de l'animal ainsi que l'évaluation de traitements dits verrous, afin d'éradiquer les biofilms se formant dans la chambre et qui sont à la source d'infections notamment systémiques. Les rats utilisés seront des mâles âgés de 8 semaines dont la taille permet l'insertion de cathéter de type pédiatrique. Ce protocole qui implique 940 animaux prévoit 4 procédures de sévérité modérée, les effets de la chirurgie étant estompés par, en plus de l'anesthésie générale, l'utilisation d'analgésique et anesthésique locaux au niveau des sutures. De plus, tous signes d'infection constituent un point limite entraînant l'euthanasie de l'animal, évitant ainsi toute souffrance. Précisions : Plusieurs axes seront développés selon les exigences 3R (réduction, remplacement, raffinement) afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'affiner les expériences :

- Expériences in vivo proposées uniquement en l'absence d'alternative expérimentale in vitro ; décision prise de manière collégiale avec l'ensemble des investigateurs.
- Protocoles rédigés en amont pour éliminer tout risque d'expérience non indispensable (rejet d'investigations discutables)
- Utilisation du nombre minimal d'animaux permettant de répondre à la question posée, tant sur le plan biologique que statistique.
- Utilisation de souches bactériennes bioluminescentes, émettant naturellement de la lumière détectable à l'extérieur de l'animal, permettant ainsi un suivi ne nécessitant pas d'euthanasie des animaux pour évaluer l'évolution de la colonisation bactérienne.
- Réalisation d'expérimentations préalables in vitro pour étudier l'effet de différentes formulations thérapeutiques pour l'éradication des biofilms.
- Réduction du stress, de l'inconfort et de la douleur : acclimatation des animaux à l'animalerie avant démarrage des protocoles, avec visite quotidienne, utilisation d'anesthésiques et antalgiques lors de l'implantation des cathéters, anesthésie gazeuse (isoflurane) et non chimique pour observation en bioluminescence, enrichissement du milieu, surveillance quotidienne des critères de douleur avec recherche des points limites.

**8664** La taurine est un acide aminé dont les propriétés anti-oxydantes et protectrices sont largement étudiées. Elle semble jouer un rôle prépondérant au niveau de la rétine, où la baisse de sa concentration est associée à la mort des photorécepteurs et des cellules ganglionnaires, dont les prolongements forment le nerf optique. Les taux plasmatique et vitréen de taurine baissant au cours d'un diabète, ceci pourrait entraîner une diminution de la taurine rétinienne, et contribuer aux symptômes visuels associés à cette maladie. Comme la taurine est fournie en large partie par l'alimentation, elle pourrait être un nutriment permettant de préserver la rétine chez les patients diabétiques.

L'étude proposée consiste, chez des souris diabétiques de type 1 (absence de production d'insuline), à mesurer les taux rétinien et plasmatiques de cet acide aminé, en recherchant une corrélation entre

ces taux et les anomalies rétinienne anatomiques et fonctionnelles, ainsi qu'un effet protecteur d'une supplémentation en taurine via l'eau de boisson.

La littérature taurine + rétine est beaucoup plus étoffée chez les mammifères que chez les vertébrés aquatiques (232 articles pour le rat, 47 pour la souris, 4 pour le poisson-zèbre). De plus la tension en oxygène est plus élevée chez les animaux aquatiques que chez les mammifères, ce qui peut interférer avec l'action anti-oxydante de la taurine. Les effets du diabète sur la rétine sont également mieux caractérisés chez les mammifères que chez les poissons (589 articles souris + diabète + rétine, 4 chez le poisson-zèbre). Si la concentration plasmatique de taurine est plus élevée chez les rongeurs que chez les primates, la concentration rétinienne mesurée chez la souris est proche de celle rapportée chez le singe (elle n'a pas encore été déterminée chez l'homme). La souris nous semble donc être un modèle approprié pour étudier les interactions entre diabète et taurine au niveau de la rétine, et rechercher un effet protecteur de cet acide aminé sur les lésions rétinienne précoces causées par le diabète.

A part les dosages de taurine, réalisés post mortem, les expériences proposées reprennent des approches de clinique humaine (électrorétinographie, imagerie de l'œil, dosage du glucose dans le sang) réalisées sans anesthésie chez les patients. Elles seront pratiquées de façon équivalente chez la souris, mais sous anesthésie puisque qu'elles nécessitent l'immobilité du "patient". L'anesthésie gazeuse sera préférée à une anesthésie par injection pour le dosage du glucose et l'imagerie de l'œil, expériences courtes. Un anesthésique local sera utilisé pour l'électrorétinographie, afin de minimiser l'inconfort pouvant être causé par le contact de l'électrode sur la cornée. Pendant toute la période de diabète, les animaux seront régulièrement observés, avec un change des cages tous les deux jours, un suivi de la glycémie et un apport d'insuline si besoin. Le nombre total de souris nécessaires à l'étude (88) a été établi en fonction de la baisse espérée du taux rétinien de taurine et des écart-types des mesures de ce type déjà effectuées, afin d'assurer la validité statistique des résultats. Des animaux supplémentaires sont prévus afin de s'assurer du modèle de diabète au préalable (27), ce qui porte le total d'animaux à 115

**8665** Les archéozoologues tentent depuis des décennies de documenter les premières étapes du processus de domestication animale, amorcé au Proche orient il y a plus de 12 000 ans, à partir de leurs vestiges osseux. Cependant les marqueurs morphologiques de la domestication utilisés par les archéozoologues reposent sur des caractères issus d'une différenciation génétique produite par une forte sélection artificielle. Or, il est peu probable qu'une telle sélection fut en place au début du processus de domestication des ongulés. En revanche, les changements morphologiques d'origine plastique dues à la vie en captivité dans un environnement contrôlé par l'homme devraient être détectables car les structures internes et externes de l'os qui se modèlent et remodelent en permanence en fonction des différents régimes d'activité de l'individu. Bien que les réponses plastiques à la captivité représente un marqueur des premières étapes de la domestication applicable aux restes archéologiques de la majorité des espèces animales impliquées dans la domestication, cette voie de recherche n'a encore été que peu ou pas explorée car elle nécessite une recherche expérimentale in vivo.

Le présent projet a pour objectif de mesurer les effets de la captivité sur le développement du squelette (plasticité) du sanglier (*Sus scrofa*). Les conséquences de la réduction de mobilité induite par la captivité seront testées sur 24 individus en comparant les trajectoires ontogénétiques de deux lots expérimentaux de 12 individus en contextes fonctionnels de semi-liberté et de stabulation. Les changements squelettiques au cours de la croissance des animaux seront caractérisés par l'utilisation de scanners CT (Computer Tomography) effectués de façon longitudinale au cours de la vie des individus. Les dernières avancées des approches 3D en biomécanique et en morphométrie géométrique seront utilisées pour accéder à la signature du mode de vie inscrit dans les structures internes et externes des os longs des membres (fémur, tibia et humérus) et les os du tarse (calcanéum et talus) souvent bien conservés dans les vestiges archéologiques. Les tendances développementales serviront de référentiel et permettront l'identification de marqueurs qui seront comparés à des séries archéologiques de *Sus scrofa*. Dans un premier temps nous testerons la validité de l'approche avec des séries archéologiques dont le statut domestique et sauvage ne fait aucune ambiguïté. Dans un second temps, le modèle sera appliqué à des séries archéologiques de

statut inconnu afin d'inférer le régime d'activité captif ou sauvage de ces derniers. Ce projet de recherche reposera sur une réelle interdisciplinarité entre écologie fonctionnelle, biologie évolutive, anatomie fonctionnelle, biomécanique et bioarchéologique afin de réussir une approche originale sur la caractérisation des premières étapes de la domestication. Les résultats issus de ce projet contribueront également à la connaissance du rôle de la plasticité développementale dans l'évolution de nouveaux phénotypes.

Remplacement : il n'existe pas d'approche alternative permettant le remplacement du modèle animal dans notre contexte expérimental.

Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux nécessaire (24) a été évalué pour permettre la mise en évidence de conséquences faibles de la réduction de mobilité sur le développement du système musculo-squelettique.

Raffinement : Un entraînement spécifique de type medical training sera réalisé sur les animaux pour faciliter la contention et réduire le stress. Un enrichissement sera également mis en place pour favoriser l'expression d'un répertoire comportemental naturel ainsi que d'augmenter le bien-être des animaux (enrichissements par mastication, enrichissements alimentaires et d'affouragement). Les approches d'imagerie utilisées dans le projet sont non invasives et sans conséquences pour la santé de l'animal.

**8666** La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise par des troubles importants de la motricité qui sont causés par la mort des neurones dopaminergiques d'un noyau cérébral appelé substance noire compacte. A ce jour, toutes les stratégies essayées pour empêcher ou ralentir la progression de la maladie ont échoué. Ces échecs sont notamment dus au fait que les symptômes moteurs apparaissent uniquement lorsque 60 à 70% des neurones dopaminergiques ont disparu : il est donc déjà trop tard pour intervenir. Il faudrait donc pouvoir diagnostiquer la maladie avant que les symptômes moteurs n'apparaissent, pendant la phase « silencieuse » de neurodégénérescence. Une solution est de trouver des marqueurs circulants (car identifiables à partir d'une simple prise de sang) précoces de la maladie. Cette approche est difficile, voire impossible chez l'homme puisque nous ne savons pas diagnostiquer la maladie avant l'apparition des problèmes moteurs. Par contre, chez l'animal, nous pouvons contrôler le degré de perte de neurones dopaminergiques et ainsi étudier différents marqueurs à un stade pré-moteur de la maladie, quand la disparition des neurones dopaminergiques n'est pas encore assez importante pour induire des déficits moteurs. Cette étude nous permettra également d'étudier l'effet de différents traitements sur ces marqueurs, puisqu'ils peuvent être utilisés également comme des outils très efficaces et objectifs pour évaluer bénéfices et effets secondaires de nouvelles molécules.

Le rat apparait comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce de plusieurs modèles pré-moteurs bien caractérisés de la maladie de Parkinson. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (3 procédures expérimentales) est de 192.

Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Un suivi longitudinal permettra de répéter certaines mesures afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires par groupe.

Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales de classe modérée. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale avec une prise en charge antalgique adéquate. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de bien-être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Le projet traitant d'une maladie cérébrale complexe et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

**8667** L'anguille européenne est un poisson migrateur classé comme espèce en danger critique d'extinction. Cette situation a motivé l'adoption de mesures de restauration du stock qui doivent agir sur l'ensemble

des causes de mortalité de l'espèce afin de reconstituer la biomasse en géniteurs d'anguille et favoriser leur échappement vers la mer (dévalaison) pour aller se reproduire. Afin de mesurer l'efficacité des mesures conservatoires et améliorer les connaissances sur l'espèce, des réseaux de suivi ont été mis en place sur des rivières index de référence dans les bassins-versants sélectionnés comme unités de gestion anguille. Développé sur une de ces rivières, le projet s'attache à un de leurs objectifs réglementaires : l'étude de la relation existant entre population en place dans le bassin-versant (stock d'anguilles jaunes) et dévalaison.

Cela implique un marquage précoce dans la vie de l'animal (au stade jaune) pour pouvoir suivre les déplacements sur plusieurs années (10 à 15 ans) jusqu'à leur argenture (préparation à la dévalaison) et échappement vers la mer. Pour ce type d'étude, les puces électromagnétiques RFID (Radio Frequency Identification) appelées pit-tags répondent bien aux critères de durée de vie (quasi illimitée) et de taille de marque (restreinte) pour être implantées sur des anguilles jaunes de taille variable mais on connaît leur portée de détectabilité limitée. Notre premier objectif a donc été de développer des antennes RFID filaires de grandes dimensions et d'optimiser leurs capacités de détection et d'autonomie. Les phases de développement menées sur deux sites pilotes de la Dronne ont fait l'objet de nombreux essais réalisés sur quatre prototypes d'antennes dans différentes conditions hydrologiques et à partir d'objets inertes dotés de pit-tags de différentes tailles. Bien que jugés suffisamment performants, l'opérativité des prototypes doit maintenant être validée par une phase biologique avant d'envisager leur déploiement à l'échelle de l'axe migratoire.

Des sessions de pêches à l'électricité sur la Dronne permettront de prélever 200 anguilles jaunes maximum durant les deux ans de projet (100/an). Les lieux de pêches identifiés se trouvent à 2-3km en amont de chaque site pilote. Après sélection (bon état sanitaire, taille supérieure à 300mm), 50 anguilles jaunes par site et par an seront marquées sous anesthésie par insertion intra abdominale d'un pit-tag (23 ou 32mm selon la taille de l'animal) avant d'être relâchées en rivière sur leur lieu de pêche après une courte phase de récupération en vivier. Leurs déplacements seront suivis grâce aux antennes RFID qui enregistrent en continu le passage de chaque individu. De plus, pour s'assurer des capacités de détection (puissance, fiabilité) des antennes, notamment en condition hivernale de crue et compléter nos données sur la phase de dévalaison, 60 anguilles argentées (30/an) seront suivies simultanément par RFID et pistage radio (méthode déjà expérimentée en hiver sur ce cours d'eau) durant les deux prochaines saisons de dévalaison (novembre à mars). En tirant parti de piégeages effectués en période de dévalaison à une pêcherie expérimentale, 15 anguilles argentées par site et par an (en bon état sanitaire apparent et d'une taille de 600mm minimum) seront marquées sous anesthésie par implantation dans la cavité abdominale d'un émetteur radio (7 ou 8g) et d'un pit-tag (23 ou 32mm). Le marquage sera effectué après une stabulation post-piégeage de 24h à 72h maximum dans un bassin en circuit ouvert alimenté en eau de rivière. Les sujets marqués seront ensuite maintenus 24h en observation dans un autre bassin en circuit ouvert. Des lots de 3 à 5 individus (par site) provenant de piégeages répartis sur toute la saison de dévalaison devraient être relâchés en vagues successives suivant l'hydrologie saisonnière rencontrée chaque année. Comme pour les anguilles jaunes, les lâchers se feront à 2-3km en amont des sites pilotes, soit après un transport en voiture de 3min pour le site 2 (lieu du piégeage) et moins de 25min pour le site 1. Quatre stations d'écoute radio continue permettront de suivre finement les déplacements sur les sites pour valider l'efficacité des antennes RFID. Des suivis radio le long de l'axe migratoire ainsi qu'une station d'écoute continue en sortie d'axe permettront de collecter des informations complémentaires sur la phase de dévalaison.

Travaillant sur le comportement des anguilles en milieu naturel, nous devons passer de l'objet inerte à l'individu pour valider notre méthodologie RFID et il nous est impossible de remplacer ces poissons par d'autres objets d'étude. Nous pouvons difficilement réduire le nombre d'individus utilisés car nous souhaitons estimer les capacités des prototypes RFID en différentes conditions hydrologiques (avec le risque de non détection du pit-tag, surtout en période de crue) et donc, un effectif de 100 anguilles jaunes par an nous semble approprié. Ayant validé le radiopistage en situation de crue, un effectif de 30 anguilles argentées par an nous semble suffisant en double marquage pour parvenir à quelques conclusions sur l'efficacité hivernale des antennes RFID et pour décrire la variabilité du comportement de dévalaison. En termes de raffinement des procédures, les poissons en expérimentation seront placés en viviers dans la rivière ou en bassins en circuits ouverts alimentés en eau de rivière pour

limiter les situations de stress induites par un choc thermique et/ou physico-chimique. Toutes les manipulations se feront sous anesthésie (adaptée à la procédure de marquage, taille du sujet et température ambiante) selon des protocoles standardisés validés chez l'anguille (impacts limités sur la survie et le comportement). Les protocoles sont développés pour limiter la durée de l'opération, le temps entre capture et lâcher et le transport entre lieux de capture et de lâcher afin de réduire les risques d'infection et les biais comportementaux. L'ensemble des poissons ne sera remis à l'eau qu'après contrôle de l'état sanitaire.

**8668** Cette séance de travaux pratiques (TP) chez la souris est destinée à des étudiants dont la formation peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes publics ou privés de recherche et par les industriels.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Les objectifs pédagogiques de ces travaux pratiques sont de plusieurs ordres :

- D'un point de vue pharmacologique : mettre en évidence l'interaction entre un neuroleptique (la chlorpromazine) et un mélange anesthésique de kétamine et xylazine (observer les effets de la chlorpromazine seule puis associée à l'anesthésique sur le comportement des animaux)
- D'un point de vue éthique (raffinement) : mettre en évidence l'importance d'utiliser une molécule en prémédication (ici la chlorpromazine) avant de réaliser une anesthésie, sensibiliser les étudiants à cette notion ainsi qu'à l'utilisation de l'animal en expérimentation
- D'un point de vue expérimental chez l'animal : former les étudiants à la préhension / contention de la souris vigile et à la réalisation d'une injection intrapéritonéale (IP) chez la souris ; apprendre à observer le comportement des animaux ; savoir recueillir des données expérimentales de façon exhaustive afin de répondre à l'objectif de l'étude (sensibilisation à la nécessité de préparer une étude afin d'en tirer les résultats attendus sans avoir besoin de les reproduire)

Réduction : Les étudiants sont répartis par binôme et deux lots de deux animaux sont constitués par binôme (1 lot contrôle et 1 lot expérimental). Ainsi lors d'une séance, 2 souris par étudiant seront utilisées. Chaque étudiant prendra donc en charge les traitements et le suivi d'un animal par lot pour évaluer les effets d'une prémédication sur la narcose induite par le mélange anesthésique. Afin de réduire le nombre d'animaux, ces souris seront également réutilisées la semaine suivante pour un deuxième TP réalisé sur la souris avec une procédure de degré de sévérité équivalent, selon la validation du vétérinaire référent.

Chaque promotion comporte au maximum 50 étudiants, avec 2 souris par étudiant. La promotion est répartie en 2 groupes de 25 étudiants et les TP ont donc lieu sur 2 séances (1 séance par groupe d'étudiants). Chaque séance est encadrée par deux enseignants, 4 souris de démonstration (2 par enseignant) seront donc nécessaires et seront utilisées lors des deux séances. Cinq souris supplémentaires seront également prévues chaque année en cas de soucis lors des TP (souris dont l'état de santé ne permet pas l'intégration au protocole expérimental par exemple).

Ainsi  $50 \times 2 + 4 \times 5 = 109$  souris seront nécessaires pour un an pour 50 étudiants et  $109 \times 5 = 545$  souris sur 5 ans pour 250 étudiants. Ces chiffres seront évidemment revus à la baisse si le nombre d'étudiant est inférieur à 50 par promotion.

Raffinement : les animaux seront hébergés par groupe de 12 animaux maximum socialement harmonieux, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (papier absorbant et une petite maison soit en polycarbonate soit en carton). Après avoir reçu le neuroleptique, les animaux seront placés sous une lampe chauffante afin d'éviter tout risque d'hypothermie. Les animaux endormis, après l'administration du mélange anesthésique, seront placés sur le dos, isolés de la paille par un tapis et réchauffés à l'aide d'une lampe chauffante afin de prévenir toute hypothermie. Ils seront observés régulièrement jusqu'à leur réveil (récupération du réflexe de posture) et leur retour en cage.

Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le programme pédagogique national prévoit, en pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part d'évaluer in vivo les effets des molécules étudiées et d'autre part l'apprentissage par nos étudiants de la technique d'administration IP chez l'animal vigile.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration des substances chez l'animal vigile....) que sur le plan clinique (observation des effets induits par les substances étudiées).

**8669** La dermatite atopique est une pathologie allergique touchant la peau et atteignant préférentiellement les enfants, de diagnostic clinique et dont le traitement est fonction des symptômes observés. C'est une maladie chronique qui évolue par poussées, entrecoupées de périodes calmes ou les lésions sont minimales.

Un peu moins du tiers des enfants est concerné. La dermatite atopique peut atteindre jusqu'à 10 % des adultes. Elle débute dans près de la moitié des cas avant le sixième mois et dans la majorité des cas, avant la cinquième année de l'enfant. Les lésions sont situées chez le nourrisson sur les convexités des joues, des membres et du cuir chevelu. Chez l'enfant plus âgé et l'adulte, les lésions siègent sur les plis de flexion des membres. Ces lésions se caractérisent par une sécheresse cutanée importante ou par des lésions inflammatoires : éruption cutanée, desquamation de la peau et démangeaisons (prurit). Par ailleurs, l'inflammation cutanée peut se maintenir voire s'aggraver sous l'effet d'autres facteurs qui ne sont pas des allergènes : souvent des irritants tels que produits cosmétiques, vêtements en polyester...

La dermatite atopique survient dans le spectre de l'atopie, c'est-à-dire chez des sujets génétiquement prédisposés à l'allergie et à ses manifestations (formes allergiques de l'asthme, de la rhinite, de la conjonctivite, de l'urticaire, et l'allergie alimentaire). Dans 60 % des cas, un des parents est atopique. Un des facteurs prédominant dans la genèse de la dermatite atopique est la sécheresse cutanée. Des facteurs extérieurs tels que le climat, temps froid et sec, ou le stress peuvent également être incriminés.

La dermatite atopique comporte au minimum 3 phases différentes. Une première phase, apparaissant comme de l'eczéma sans signes de sensibilisation, peut durer toute la vie chez 20 à 30 % des patients atteints de dermatite atopique. Une deuxième phase, qui se présente comme la véritable dermatite atopique, avec sensibilisation, affecte 70 à 80 % des patients. Une troisième phase qui semble toucher seulement les patients atteints d'une véritable dermatite atopique et se caractérise par des signes de sensibilisation médiés par une immunoglobuline (IgE) à une protéine de l'organisme (autosensibilisation). Ensuite peut venir une phase variante d'auto-immunité. Des surinfections bactérienne, favorisée par le grattage, virale, dermite de contact secondaire ou même retard de croissance peuvent survenir.

Le traitement des poussées de la dermatite atopique se fait en utilisant des dermocorticoïdes sous stricte surveillance médicale et des antihistaminiques en cas de démangeaisons associées. L'utilisation d'antibiotiques ou d'antiseptiques peut être nécessaire en cas de surinfection bactérienne, ainsi que l'utilisation d'antiviraux pour les surinfections virales.

Le but de ce projet d'une durée de 5 ans est d'étudier les effets de 25 à 100 composés, naturels ou non, modifiés chimiquement ou non, sur le traitement de dermatite atopique induite chez la souris BALB/c. Nous utiliserons un maximum de 1400 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour l'ensemble de ce projet.

Un maximum de 25 lots de 56 souris BALB/c chacun seront utilisés, chaque lot de 56 souris étant réparti en 7 groupes de 8 souris avec : 1 groupe sans induction de dermatite atopique traité avec un véhicule neutre et 6 groupes avec induction de dermatite atopique traités respectivement avec un véhicule neutre, 1 composé à 4 doses différentes ou 2 composés à 2 doses différentes ou 4 composés à 1 seule dose, et une référence pharmaceutique utilisé pour le traitement de la dermatite atopique chez l'Homme.

Les procédures expérimentales appliquées seront : a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) des applications cutanées pendant 6 semaines (J1 à J42) d'un mélange acétone/huile contenant

ou non l'agent chimique inducteur de la dermatite atopique, c) le traitement des animaux par administration des composés à tester pendant 7 jours (J35 à J42) selon la voie d'administration utilisée, d) l'évaluation comportementale des animaux dans un dispositif expérimental appelé open-field ou champ ouvert pendant 20 minutes, 24 heures après le dernier traitement (J43) avec enregistrement vidéo pour la quantification de différents paramètres, e) un prélèvement de sang avant à l'euthanasie des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J43). Des analyses de prélèvements cutanés effectués sur l'ensemble des animaux seront également réalisées.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles in vitro permettant l'évaluation de l'efficacité de composés sur la dermatite atopique et sur le comportement (Remplacement) et nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle de dermatite atopique et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entraînera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence de la dermatite atopique dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

**8670** Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau d'origine inconnue et non contagieuse, affection dermatologique qui touche 2 à 3 % de la population mondiale, atteignant de manière équivalente les hommes et les femmes.

Le psoriasis en plaques, appelé également psoriasis vulgaris, est la forme la plus courante du psoriasis (plus de 90 % des cas).

Dans sa forme bénigne et typique, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu ; le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Le traitement est adapté en fonction de la gravité et du retentissement sur la qualité de vie des patients.

Les causes précises du psoriasis sont inconnues bien que, dans près de 30 % des cas, une prédisposition familiale existe, surtout si des facteurs externes viennent se rajouter. L'épiderme se renouvelle trop rapidement, en seulement quatre à six jours, au lieu des trois semaines habituelles ce qui engendre des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et forment une couche de pellicules blanches appelées squames. Parfaitement inoffensives, celles-ci ont pourtant le désavantage d'être inesthétiques.

Le but de ce projet d'une durée de 5 ans est d'étudier les effets de 25 à 100 composés, naturels ou non, modifiés chimiquement ou non, sur le traitement de psoriasis induit chez la souris BALB/c. Nous utiliserons un maximum de 1400 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour l'ensemble de ce projet.

Un maximum de 25 lots de 56 souris BALB/c chacun seront utilisés, chaque lot de 56 souris étant réparti en 7 groupes de 8 souris avec : 1 groupe sans induction de psoriasis traité avec un véhicule neutre et 6 groupes avec induction de psoriasis traités respectivement avec un véhicule neutre, 1 composé à 4 doses différentes ou 2 composés à 2 doses différentes ou 4 composés à 1 seule dose, et une référence pharmaceutique utilisé pour le traitement du psoriasis chez l'Homme. Les produits



seront administrés par application cutanée, par administration orale ou par injection sous-cutanée. Les procédures expérimentales appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) l'application cutanée pendant 13 jours (J1 à J13) d'une pommade contenant l'agent inducteur de psoriasis ou d'une pommade neutre, c) le traitement des animaux par administration des composés à tester pendant 7 jours (J7 à J13) selon la voie d'administration utilisée, d) l'évaluation comportementale de animaux dans un dispositif expérimental appelé open-field ou champ ouvert pendant 10 minutes, 24 heures après le dernier traitement (J14) avec enregistrement vidéo pour la quantification de différents paramètres, e) un prélèvement de sang avant à l'euthanasie des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J14). Des analyses de prélèvements cutanés effectués sur l'ensemble des animaux seront également réalisées.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton (Cell Best SP) seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant l'évaluation comportementale de composés (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre minimum d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle de psoriasis et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours l'étude, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du psoriasis dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

**8671** Notre projet de recherche consiste à utiliser des souris pour produire des anticorps monoclonaux contre des cibles protéiques qui sont augmentées dans le sérum de patients atteints de phéochromocytome, une tumeur neuroendocrine de la glande surrénale. Cette dernière se caractérise par une hypersécrétion de catécholamines, entraînant comme symptômes principaux une hypertension artérielle importante ainsi que des risques aggravés d'accidents cardiaques.

Pour chaque cible protéique, 3 peptides immunogènes ont été mis en évidence. Pour chaque peptide 2 souris seront immunisées soit un total de 6 souris par cibles potentielles. Dans l'état actuel du projet, 5 cibles ont été pour l'instant identifiées ce qui porte à 30 le nombre total de souris.

**REMPLETER** : L'objectif principal est de développer des anticorps monoclonaux afin de mettre au point un test sanguin de diagnostic du phéochromocytome voire potentiellement pour d'autres tumeurs neuroendocrines. Pour développer des tests non invasifs, nous allons effectuer la production des anticorps monoclonaux murins dirigés spécifiquement contre des épitopes des séquences humaines des peptides d'intérêt du phéochromocytome. Les anticorps sont des outils à utiliser pour des fins diagnostics. Le recours aux animaux est indispensable car les méthodes d'immunisation *in vitro* de lymphocytes B génère des anticorps instables et souvent de faible affinité ne pouvant être utilisés dans les diagnostics.

**REDUIRE** : Pour chaque peptide, seulement 2 souris sont immunisées. Réduire à une souris par peptide représente un risque élevé car l'immunisation peut être très variable d'un animal à l'autre. A partir des cellules de la rate des souris qui montrent un bon titre, des clones sont préparés pour la production d'anticorps sans avoir recours de nouveau à l'expérimentation chez l'animal.

**RAFFINER** : Une désinfection locale de la peau est réalisée avant chaque injection. Les animaux sont observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et euthanasiés en cas de perte significative de poids et d'infection locale cutanée.

Le projet nécessite des prélèvements sanguins dans la limite de 2 à 3 fois avec des volumes adaptés à l'espèce. Aussi, pour limiter le stress et la douleur, ceux-ci seront effectués sous anesthésie gazeuse et selon les recommandations en vigueur chez cette espèce. Ces prélèvements sont

nécessaires pour mesurer la quantité d'anticorps produits. Les animaux seront hébergés en cage collective (maximum à 2 ou 3 par cage) dans un milieu enrichi (nid, bâton à ronger, coton) et seront surveillés par le personnel. Les signes généraux de détresse et de mal-être seront surveillés tout au long du protocole.

**8672** La consommation de fructose, qui a fortement augmenté ces dernières années notamment par l'utilisation de sirop riche en fructose dans les produits transformés, est parallèle à celle du nombre de patients atteints d'obésité. Ces données suggèrent un rôle de ce sucre dans le développement des désordres métaboliques et ont conduit l'Anses à émettre des recommandations pour développer des recherches plus approfondies sur « le lien entre consommation de sucres et pathologies associées ».

Une question qui n'a jamais été adressée directement est la capacité du cerveau à détecter le fructose. Cette question est justifiée par le nombre croissant d'études montrant que la consommation de fructose peut, chez l'homme et/ou dans des modèles animaux, moduler le comportement alimentaire ou l'état émotionnel ou la mémoire. Néanmoins, aucune étude n'a testé l'effet direct du fructose sur l'activité de neurones. Ainsi, le but de ce projet est de déterminer si le fructose joue le rôle de molécule signal au niveau cérébral, module l'activité de neurones et participe au contrôle des émotions et de la mémoire. Pour cela, nous déterminerons par immunohistochimie si l'administration (orale ou intrapéritonéale) de fructose active des régions cérébrales et lesquelles; et si l'augmentation sélective de la concentration en fructose dans le cerveau altère les émotions et la mémoire grâce à l'utilisation de tests comportementaux spécifiques.

Ce projet de deux ans sera réalisé sur 112 souris mâles adultes. L'étude de comportements anxio-dépressifs et de la mémoire ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (anesthésie, utilisation d'antalgique lors des chirurgies) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux.

**8673** En plus d'être un facteur de risque pour les maladies métaboliques et cardiovasculaires, le surpoids et l'obésité affectent les fonctions cérébrales et ont été associées à une forte prévalence de dysfonctions cognitives qui évoluent souvent en désordres psychiatriques. Chez les modèles animaux, une littérature abondante montre que l'obésité induite par un régime riche en lipides (HL) est délétère pour la mémoire dépendante de l'hippocampe, une structure cérébrale impliquée dans la mémoire spatiale et la mémoire du contexte.

Par ailleurs, il est connu que pour s'adapter à la disponibilité des aliments et aux besoins de l'organisme, le métabolisme énergétique a évolué de façon cyclique. Ces cycles métaboliques dérivent de mécanismes biologiques fonctionnant sur 24h (appelés horloges circadiennes cellulaires). Deux équipes de recherche ont récemment montré que les conséquences métaboliques (insuline, leptine) et pondérales d'un régime HL pouvaient être largement atténuées lorsqu'on empêche les animaux de manger dans leur phase inactive (le jour pour les rongeurs) même si la consommation calorique totale est identique aux animaux nourris ad libitum. D'un point de vue mécanistique, cette synchronisation forcée de la prise alimentaire améliore différentes voies de signalisation ainsi que l'oscillation sur 24h de gènes cibles dans le foie et le tissu adipeux. L'influence de la synchronisation forcée n'a été étudiée dans le cerveau qu'au travers de quelques gènes dans l'hypothalamus, montrant une restauration de l'expression cyclique sur 24h de ces gènes.

Lors de nos études précédentes, nous avons montré que la consommation d'un régime HL pendant l'adolescence conduit à des déficits de plasticité et de mémoire dépendantes de l'hippocampe. Nous faisons l'hypothèse que la synchronisation forcée de la prise alimentaire va atténuer les effets du régime HL consommé pendant l'adolescence sur les déficits de mémoire, en restaurant l'oscillation sur 24h des gènes de la plasticité dans l'hippocampe.

L'objectif principal du projet est d'analyser l'influence de la synchronisation alimentaire forcée sur les déficits de mémoire induit par un régime HL consommé pendant l'adolescence et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués. Plus spécifiquement, notre premier objectif est d'établir si la

synchronisation alimentaire forcée améliore les déficits de mémoire dépendante de l'hippocampe. Notre deuxième objectif est d'évaluer au sein de l'hippocampe si l'oscillation sur 24h de certains gènes associés à la mémoire est perturbée par le régime HL et restaurée par la synchronisation forcée.

Nous étudierons 4 groupes expérimentaux : souris sous régime contrôle ad libitum ou en synchronisation forcée et souris sous régime HL ad libitum ou en synchronisation forcée. Dans la première expérience les 4 groupes de souris subiront des tests expérimentaux pour estimer leur mémoire et du sang sera prélevé pour faire des mesures d'hormone qui influence la mémoire. Au sacrifice chacun des 4 groupes expérimentaux sera divisé en 4 à raison de 5 animaux par groupe pour mesurer l'expression de gènes toutes les 6 heures sur 24h. Dans une 2ème expérience nous mesurerons comparativement, sur une nouvelle cohorte, le niveau d'anxiété des souris. Les souris seront sacrifiées à différents temps par rapport à la 1ère cohorte (6 par groupe/temps) et 2 souris/groupes/temps seront sacrifiées aux mêmes temps que la 1ère cohorte pour mettre ensemble les résultats des 2 cohortes. Enfin une 3ème cohorte est prévue pour compléter les données comportementales et pour mesurer dans le cerveau à différents temps l'activation neuronale par immunohistochimie (5 souris/groupes/temps).

Nous utilisons des souris C57Bl/6 males qui sont prones à l'obésité lorsque soumises à un régime HL. Les études comportementales de mémoire couplées à des régimes hyperlipidiques ne peuvent se faire que sur des mammifères. Nous utiliserons 288 souris au total, le nombre de souris utilisées a été réduit au minimum afin de pouvoir faire des analyses statistiques pour comparer les groupes expérimentaux. Les souris sont manipulées quotidiennement avant les tests comportementaux afin de les habituer à l'expérimentateur et ainsi de réduire le stress. Au sacrifice les animaux seront anesthésiés pour qu'il n'y ait pas de souffrance.

**8674** La toxoplasmose congénitale pose un problème économique majeur à l'industrie agroalimentaire car elle est la première cause de mortalité fœtale et d'avortements spontanés chez les ovins (plus d'1 million de cas par an en Europe). L'infection primaire par le parasite entraîne une réponse immunitaire conférant une protection permanente contre une réinfection et contre une transmission mère-enfant. Ainsi il devrait être possible de développer un vaccin inocuitaire et efficace contre la toxoplasmose acquise et congénitale. Un vaccin vivant atténué est commercialisé dans certains pays pour un usage vétérinaire. Cependant, une possibilité existe d'avoir une réversion de ces parasites vers une forme pathogénique, le rendant inutilisable pour une vaccination humaine. De plus, ce type de vaccin est cher, nécessite un stockage particulier, cause des effets secondaires non désirés, est difficile à manipuler et à une durée de demi-vie courte. Actuellement, il n'existe donc aucun moyen de lutte efficace contre la toxoplasmose congénitale ovine. Dans le but de dépasser ces problèmes, les recherches actuelles se tournent vers les vaccins sous-unitaires. Ce projet est concentré sur la conception d'un vaccin muqueux nouvelle génération permettant la délivrance d'antigènes capable de cibler les muqueuses et leurs cellules immunitaires. L'étude de faisabilité chez la souris a démontré que le vaccin induisait une réponse immunitaire humorale et cellulaire forte, ainsi qu'une protection contre l'infection par *Toxoplasma gondii*. Il pourrait donc réduire ou prévenir la formation de kystes dans les tissus, source de contamination pour la viande consommée par l'Homme. L'objectif de ce projet est de tester ce candidat vaccin synthétique efficace pour une application vétérinaire. Une première étape permettra la sélection d'une formulation vaccinale optimale pour des études cliniques chez la brebis (espèce cible) et une seconde de valider ce candidat vaccin. Dans le cadre de ce projet, le choix du nombre d'animaux est parfaitement respecté. Il n'y a pas d'autres modèles alternatifs, car l'objectif premier de ce projet est de valider un vaccin vétérinaire pour les animaux de rente contre la toxoplasmose congénitale. Le nombre d'animaux par expérimentation a été calculé selon les plans d'expérimentations statistiques et les données validées utilisées en médecine vétérinaire pour valider les nouveaux vaccins. Il se base également sur les données zootechniques d'élevage et de reproduction de ces brebis. Chaque animal utilisé permettra à chaque étape importante du protocole de comprendre la réponse immunitaire de la brebis et de montrer la protection vaccinale au cours de la gestion ovine. Dans les deux cas, les brebis seront vaccinées selon les 4 voies suivantes : soit par voie intradermique, soit par voie nasale, soit par voie buccale, soit par voie conjonctivale puis infectées par voie orale à mi gestation. Le projet sera réalisé en deux étapes qui

nécessiteront un total de 120 brebis sur une période de 4 ans. Le nombre d'animaux est déterminé afin d'obtenir environ 8 brebis gestantes par lot. En effet, notre expérience dans ce domaine nous laisse espérer un rendement de gestation entre 60 et 70% soit pour un effectif initial de 12 brebis par lot. Le projet global est divisé en deux expérimentations (1/ évaluation de la meilleure voie d'immunisation dans un contexte de challenge infectieux (60 brebis) et 2/ validation et optimisation du candidat vaccin dans un contexte de challenge infectieux (60 brebis) afin de garantir des bonnes conditions d'hébergement des animaux en fonction de la superficie du bâtiment A2 dans lequel ils seront hébergés. Si toute une partie mécanistique a pu être étudiée in vitro, il est impossible de reproduire un modèle de régulation complexe permettant de valider notre candidat vaccin in vitro ni de mimer ce qui pourrait se passer dans les élevages. Ce vaccin devrait diminuer le nombre de kystes musculaires et cérébraux et protéger les brebis gestantes contre l'avortement induit par l'infection primaire par *Toxoplasma gondii* durant la gestation (1,25 million de brebis par an en Europe avortent à cause de l'infection de ce parasite).

Ces expériences seront en accord avec la règle des 3R :

- Remplacement : Si une partie des expériences a été faite en amont sur cellules in vitro, il n'existe actuellement aucun système permettant de reproduire un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie chez l'animal cible, la brebis.
- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature.
- Raffinement : Le mouton est un animal grégaire il y a donc une vraie nécessité à favoriser l'hébergement en groupe et dans un environnement enrichi (pierre de sel).

**8675** Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer son efficacité et sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez l'animal en vue d'évaluer prématurément l'efficacité potentielle d'un produit, de mieux comprendre ses effets et/ou d'en limiter les impacts chez l'Homme. A ce jour, il n'existe pas, pour ces études, d'alternative complète validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux.

Ces études pourront être réalisées chez des espèces rongeurs et/ou non-rongeurs, selon l'effet étudié. Les primates non-humains (macaque cynomolgus) ne seront utilisés que si les autres non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet en tenant compte des éléments suivants :

- Similarité des paramètres cinétiques ou du métabolisme entre l'espèce non-rongeur choisie et l'Homme
- Réponse pharmacologique ou toxicologique spécifique observée seulement chez le primate non humain et l'homme.

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives in vitro et in silico sont utilisées au préalable pour affiner la recherche et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les études incluses dans ce projet ont une durée pouvant aller jusqu'à 6 mois, selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers, à l'aide de matériel adapté à chaque espèce et à l'effet étudié, incluent généralement observations cliniques, suivi pondéral, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang pour étudier des biomarqueurs et vérifier le passage du médicament dans le sang, examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement), examen ophtalmologique ou tout autre examen spécifique pouvant aider à la compréhension de l'effet étudié. Les prélèvements sanguins sont adaptés en terme de volume et de fréquence (conformes aux recommandations) et sont réalisés en utilisant les méthodes les moins contraignantes possibles ; par exemple microsampling et/ou training avec renforcement positif. Les animaux sont régulièrement entraînés à des manipulations et, des procédures de renforcement positif

(récompenses, jeux) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être ré-utilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour examiner les différents organes d'intérêt. Le nombre d'animaux utilisé dans ces études est fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant leur efficacité et/ou leurs mécanismes d'action et/ou leur sécurité, en sélectionnant éventuellement de manière plus spécifique d'autres candidats de la même classe pharmacologique ou d'autres modes d'administration et en diminuant le risque pour l'Homme.

Selon le nombre de candidats médicaments qui nécessiteraient la mise en place de telles études « in vivo », un maximum de 600 rongeurs, 20 lagomorphes, 40 chiens ou 40 singes pourrait être utilisé (dont des animaux ré-utilisés) sur 4 ans.

**8676** Avec plus de 8.8 millions de décès recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer représente aujourd'hui la seconde cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste la première cause de mortalité chez les patients atteints de cancer. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes, notamment 1) l'invasion des cellules tumorales à travers le tissu d'origine 2) la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, 3) l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, 4) l'extravasation c'est-à-dire le passage de la voie sanguine vers le second site et 5) la colonisation dans le site secondaire et particulièrement le poumon, le foie, la moelle osseuse et le cerveau.

Outre leur rôle dans l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt des saignements après blessure au niveau des vaisseaux sanguins, les plaquettes ont été décrites comme impliquées dans la dissémination métastatique. En effet, plusieurs études ont montré que ces dernières protègent les cellules cancéreuses circulantes du système immunitaire, facilitent l'adhésion des cellules cancéreuses à la paroi vasculaire et l'extravasation des cellules tumorales au site secondaire. A ce jour, les mécanismes mis en jeu par les plaquettes dans la dissémination métastatique restent mal connus. Cette étude participera à mettre en évidence une stratégie de ciblage des plaquettes dans le cadre d'un traitement anti-métastatique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance et le rôle que joue le récepteur plaquettaire GPVI dans la dissémination métastatique. Ce récepteur est spécifique des plaquettes, c'est-à-dire qu'il est retrouvé uniquement à la surface des plaquettes. Son rôle principal est de fixer le collagène exposé lors d'une blessure des vaisseaux sanguins. Ainsi les plaquettes recouvrent la plaie et arrêtent le saignement.

Cette glycoprotéine VI pourrait d'une part faciliter l'interaction des plaquettes avec les cellules tumorales, mais également avec les constituants des vaisseaux sanguins. Ce récepteur GPVI pourrait aussi influencer le comportement des cellules tumorales (Invasion, Migration, TEM) et favoriser ainsi la formation de métastase.

Pour cette étude nous disposons de souris déficientes pour l'expression de la GPVI sur les plaquettes. Nous disposons également d'une souris dont les plaquettes expriment la GPVI humaine. Cette protéine humaine est d'ailleurs la cible d'un anticorps en phase clinique I pour le traitement de pathologies vasculaires thrombotiques.

La collection de sang de ces souris nous permettrait d'évaluer :

- 1) le rôle de la GPVI dans les différents mécanismes mis en jeu lors de la formation de métastase
- 2) le potentiel rôle anti-métastatique de l'anticorps anti-GPVI

La formation de métastase pulmonaire chez les souris par injection de cellules tumorales nous permettrait de valider :

- 1) le rôle de la GPVI dans la formation de métastase dans un système complexe qui prend en compte l'ensemble de l'organisme
- 2) Le potentiel anti-tumoral de l'anticorps anti-GPVI

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 915 animaux (souris, *Mus musculus*).

#### Remplacer

Les études sur le rôle des plaquettes in vitro sont rendues difficiles du fait de l'absence de production ou de culture de lignées plaquettaires. Les tests ex vivo réalisés nécessitent donc le prélèvement sur souris de sang afin d'obtenir des plaquettes.

Les études sur le rôle des plaquettes dans les métastases nécessitent d'utiliser des animaux car ce phénomène implique des interactions complexes entre les différents tissus, la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisées in vitro.

De nombreuses études préliminaires, dont la caractérisation de l'anticorps qui bloque la GPVI humaine, ont déjà été effectuées en utilisant du sang de volontaires sains pour limiter l'utilisation de souris.

#### Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique avec le t-test de Student ou un test anova selon le nombre de conditions à comparer. Les tests ex vivo seront réalisés sur trois échantillons de sang pour chaque groupe de souris et en triplicat. Les expériences in vivo seront dupliquées afin de consolider les résultats. Cette étude se fera de façon séquentielle. En effet, les résultats seront analysés et la poursuite de l'étude sera évaluée après chaque étape afin de limiter le nombre d'animaux et si les résultats ne se révèlent pas convainquants.

#### Raffiner

Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées en utilisant des modèles aigües (sur 2 à 3 semaines), plutôt que des modèles génétiques qui durent plusieurs mois, afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. De plus une attention particulière est portée aux animaux tout au cours de leur vie. Pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. Ce projet va permettre de déterminer les mécanismes moléculaires de la formation des métastases et de proposer des cibles thérapeutiques chez les patients atteints du cancer.

**8677** Les maladies du système nerveux (Alzheimer, Parkinson, Huntington...) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative caractérisée par différentes lésions, notamment des dépôts cérébraux de protéines mal conformées : les protéines bêta-amyloïde (A $\beta$ ) et tau.

Nous souhaitons aujourd'hui progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA. Depuis quelques années, plusieurs scientifiques ont montré chez le rongeur que l'amyloïdose (dépôts des protéines bêta-amyloïdes) et la tauopathie (dépôts des protéines Tau) sont expérimentalement transmissibles via l'inoculation par voies intracérébrale ou intrapéritonéale d'homogénats de cerveaux humains ou rongeurs contaminés par des dépôts de protéines amyloïdes ou tau. Notre équipe a montré que l'inoculation de cerveaux humains contaminés à des primates induit une atteinte cognitive et fonctionnelle. Des travaux récents chez l'Homme ont suggéré que la maladie peut être transmise par inoculation accidentelle d'extraits de tissus contaminés (Jaunmuktane et al., Nature, 2015).

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'induction et les conséquences fonctionnelles de l'amyloïdose et de la tauopathie générées chez les rongeurs et primates après injection stéréotaxique en intracérébrale ou intrapéritonéale d'échantillons de cerveaux prélevés post-mortem chez des patients qui présentaient des formes sporadiques (classiques) ou rapidement progressives (très agressives) de la MA. Les modèles animaux seront suivis sur un mode longitudinal (atteintes comportementales, atrophie cérébrale, charge amyloïde plasmatique, activité cérébrale au repos et électroencéphalographie) avant euthanasie et étudiés en biochimie et immunohistochimie après leur euthanasie (via injection intrapéritonéale de pentobarbital à 100 mg/kg) fixée à 1, 4 ou 8 mois post-inoculation pour les rongeurs et à 18 mois post-inoculation pour les primates. Les conséquences de la propagation de l'A $\beta$  sur la communication entre les réseaux de neurones seront étudiées in vivo par IRM fonctionnelle. Le projet décrira des mécanismes liés à l'hétérogénéité clinique de la MA.

Nous utiliserons un modèle primate non humain (PNH), le microcèbe (*Microcebus murinus*) présentant un vieillissement cérébral très proche de celui de l'Homme. Par exemple, il présente une

atrophie cérébrale liée à l'âge et est le premier PNH chez qui l'atrophie a été corrélée aux atteintes cognitives. Agés, ces PNH présentent aussi des modifications sanguines pouvant refléter des altérations précoces retrouvées chez les patients Alzheimer. Les modèles rongeurs de pathologies neurodégénératives ne présentent pas ces altérations en vieillissant. Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules. Les modèles rongeurs sont néanmoins nécessaires pour compléter les études menées chez le PNH. En effet, les études préliminaires menées chez le rongeur permettront de valider le potentiel de nos homogénats de cerveaux à induire une amyloïdose et une tauopathie. De plus, elles permettront, en cas de besoin, d'ajuster les quantités d'homogénats cérébraux injectées aux microcèbes et d'adapter la surveillance des animaux tout au long de l'étude (par exemple en cas de toxicité imprévue observée chez la souris).

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, nés et élevés en captivité, proviennent d'élevages reconnus. Le projet prévoit l'utilisation de 64 PNH et de 720 rongeurs. Ces effectifs ont été réduits au minimum nécessaire pour garantir la validité statistique des résultats.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés pour les rongeurs et les primates non humains depuis de nombreuses années, et validés par un vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux, hébergés en groupe dans un milieu enrichi garantissent leur bien-être.

**8678** La mise à contribution de modèles animaux mutés pour une protéine permet l'investigation de l'utilité de la fonction de cette protéine dans l'organisme étudié. Les modèles génétiquement modifiés disponibles actuellement sont limités à quelques espèces dont une grande majorité de souris et de rats. Malheureusement, ces animaux n'étant pas des espèces considérées comme saisonnières, ils ne sont pas adaptés à l'étude des rythmes saisonniers pour lesquels les recherches sont plus que jamais d'actualité. Effectivement, les travaux sur la saisonnalité, bien que peu nombreux, sont d'une utilité majeure pour le domaine agro-économique dans lequel les débats sur la suppression des traitements hormonaux pour les productions issues d'animaux d'élevage prennent de plus en plus d'importance. Ces productions (viande, lait, œufs, fromage) étant souvent dépendantes de la saison, la compréhension des mécanismes par lesquels les contraintes environnementales agissent sur les fonctions biologiques des espèces est donc nécessaire pour la création d'élevages non traités. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent l'importance des variations saisonnières et de leur impact physiologique chez l'humain. L'étude de l'intégration de ces facteurs saisonniers dans le système nerveux constitue donc un premier pas vers une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels l'humain est affecté par les variations annuelles de facteurs tels que la lumière ou la température. Le hamster étant le modèle de rongeur saisonnier le mieux caractérisé, nous souhaitons donc développer des modèles de hamster génétiquement modifiés permettant une étude approfondie de la fonction de certaines protéines impliquées dans la saisonnalité.

Le système CRISPR Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) est un outil permettant de couper l'ADN à un endroit ciblé du génome dans un embryon qui est ensuite réimplanté chez une mère porteuse. Les embryons manipulés, pour être génétiquement modifiés, sont produits par super-ovulation de femelles. Cette super-ovulation est pratiquée par injection d'hormones (pour augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée transgénique. Ces embryons sont ensuite micro-manipulés pour produire des animaux génétiquement modifiés et réimplantés dans une femelle mère-porteuse de la même espèce par une petite intervention chirurgicale. Les petits, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques.

Par ailleurs, de nombreuses études ont déjà montré son efficacité chez le rongeur dont le hamster Syrien chez lequel la technique a déjà été appliquée avec succès. En outre, le génome de ce hamster étant connu, les contrôles de spécificité de la lésion du gène cible pourront être réalisés.

L'utilisation de la technique du CRISPR cas9 est donc adaptée pour la génération de lignées de hamsters Syriens mutés pour des gènes cibles. Ces nouveaux modèles nous permettraient d'avancer dans la compréhension de certains mécanismes impliqués dans la saisonnalité et l'utilisation du

CRISPR Cas9 chez le hamster pourrait apporter des informations techniques importantes pour la génération future de mutations génétiques chez des espèces non-conventionnelles.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche expérimentale sur animaux. Les mécanismes saisonniers font intervenir des voies de signalisation complexes dans différents types cellulaires, tissus et organes, nous empêchant donc de travailler sur un modèle in vitro en remplaçant les animaux par des cellules isolées.

Il a été montré dans la littérature que ce système, comparé à d'autres permet de réduire le temps et le nombre d'animaux utilisés pour la génération de modèles mutés. De plus, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous nous entourons d'une équipe compétente ayant l'habitude du matériel et de la technique que nous utiliserons pour réduire le nombre de tests nécessaires à la mise au point de chaque étape. Toutes les estimations pourront être revues à la baisse concernant le nombre d'animaux si leur nécessité pour l'expérience n'était pas justifiée.

Nous avons établi qu'un total de maximum 1090 hamsters Syriens dont 1060 femelles et 30 mâles seront utilisés pour cette expérience pendant les 5 ans, néanmoins les progénitures des femelles ne seront plus considérées comme des animaux naïfs ne nous permettant pas de les utiliser dans une autre expérience. Ce nombre d'animaux s'explique surtout par le besoin de mener des expériences pilotes étant donné que la technique du CRISPR Cas9 est encore très peu utilisée chez les espèces autres que le rat et la souris. En termes de raffinement, les hamsters seront hébergés dans des cages avec de l'eau et de la nourriture ad libitum, le milieu sera enrichi avec du matériel de nidation et un barreau à ronger. Ce projet nécessite des approches invasives, une attention particulière sera donc portée à la réduction de la douleur et du stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques), d'autant plus qu'un stress excessif ou une douleur prolongée pourraient limiter l'implantation des embryons modifiés chez les femelles, compromettant ainsi l'expérience.

**8679** Les syndromes myélodysplasiques (myelodysplastic syndromes, MDS) constituent un groupe de maladies sanguine dans lesquelles les cellules qui produisent le sang prolifèrent d'une façon non contrôlée et excessivement. Souvent les MDS sont appelés également "pré-leucémies", non seulement parce que les MDS partagent beaucoup de caractéristiques avec les leucémies aiguës, mais cela est aussi dû au fait que les MDS évoluent avec une grande probabilité vers ce type de leucémie. Les MDS sont causés par un endommagement élevé de l'ADN dans les cellules. Ainsi, des patients qui portent des mutations dans des gènes responsables de la réparation de l'ADN développent avec une probabilité extrêmement élevée des MDS. En outre, un grave effet secondaire dans la thérapie des cancers par chimio- ou radiothérapie est notamment un endommagement des cellules sanguines. Environ 10% des patients guéris d'un précédent cancer, traité par chimio- ou radiothérapie, vont développer des MDS plus tard dans leur vie.

La recherche sur les MDS et leurs thérapies, et le développement de stratégies pour éviter leurs apparitions suite à un traitement anti-tumoral, restent insuffisants. Une des principales raisons est que les modèles murins expérimentaux associés à un endommagement élevé de l'ADN ne développent pas des MDS dans le passé.

Très récemment, nous avons pu développer des modèles murins qui montrent un endommagement élevé chronique de l'ADN et qui développent des symptômes des MDS. C'est pourquoi nous planifions maintenant d'utiliser ces souris afin de :

-Mieux comprendre comment un endommagement de l'ADN chronique ou un endommagement très élevé pendant un certain temps (chimiothérapie ou irradiation) peut entraîner le développement des MDS. -Utiliser ensuite notre compréhension améliorée du développement des MDS pour commencer le développement des stratégies pour préparer les cellules sanguines à un endommagement élevé afin qu'ils puissent augmenter alors leur capacité de réparation de l'ADN. -Comprendre les connexions entre endommagement de l'ADN et réaction inflammatoire dans le développement des MDS.

Nous allons établir des cohortes de vieillissement de souris normales et de souris qui montrent un endommagement élevé de l'ADN, issus des mêmes parents pour que la comparaison entre ces cohortes soit directe. Au cours de leurs vies, nous préleverons des échantillons de sang et de moelle osseuse, nous suivrons également la taille de la rate de façon non invasive, signe du développement



des MDS. Nous analyserons ensuite les caractéristiques des MDS chez la souris malade ainsi que les processus inflammatoires associés et dans une deuxième étape étudierons les effets d'agents anti-inflammatoires sur la régression de la maladie. Nous pouvons également remonter les origines du MDS pour chaque souris en analysant les échantillons pris au cours de sa vie jusqu'au déclenchement de la maladie.

Lorsque la souris montrera des signes de souffrance (mobilité réduite, perte de poids, entretien du pelage négligé), nous procéderons à la mise à mort afin de pouvoir recueillir les organes d'intérêts pour les analyses cellulaires afin d'étudier et de comparer les différents groupes traités.

Nous utilisons la souris comme modèle animal parce que sa physiologie et son système sanguin ressemblent à celui de l'homme et la plus part des techniques de la création des animaux génétiquement modifié, essentiel pour cet étude, existent que pour la souris. Nous estimons le nombre de souris nécessaire pour cette étude à environ 2200; nous utilisons deux souches de souris différentes, chacune déficiente pour un gène de réparation de l'ADN et nous les comparerons directement avec leurs frères et sœurs sans défaut génétique ("type sauvage").

Nous laissons vieillir ces souris sous différentes conditions (par exemple, avec plus d'endommagement de l'ADN ajouté) et sous observation permanente. Au cours de leur vie, des prises de sang seront pris pour effectuer une numération formule sanguine, le reste du sang sera congelé ainsi que plusieurs prélèvements de moelle osseuse pour les analyser. Les prises de sang et les échantillons au cours de la vie de la souris nous permettrons ensuite de retracer le développement de MDS étape par étape, animal par animal. Cette approche de "reconstruction de l'histoire de la maladie" nous permet d'utiliser beaucoup moins d'animaux comparé à une approche où chaque animal serait analysé seulement à son sacrifice.

D'autre part, des groupes plus petits de souris seront gardés sous les mêmes conditions, mais seront mises à mort à des dates définies. Leur analyse donnera une image plus exhaustive des stades précoces du développement des MDS. Le nombre de souris dans chaque groupe sera probablement faible pour des résultats statistiquement significatifs, mais seront combinés avec les données de vieillissement (ci-dessus) pour retracer le cours de développement des MDS.

En outre, pour mieux comprendre la cohabitation et l'interdépendance entre cellules sanguines et cellules d'os, nous planifions des expériences de transplantation des cellules sanguines "MDS" dans des souris type sauvage pour tester si les cellules causant de MDS sont capables de restaurer la maladie dans un organisme sauvage.

Les animaux sont sous surveillance permanente (poids, prise alimentaire, immobilité/atonie, taille de la rate) et par prélèvements réguliers (prise de sang). Dès qu'un animal sera immobile, incapable de se nourrir ou montre une perte de poids important (plus de 20%), l'animal sera mis à mort par surdose d'anesthésie puis dislocation cervicale. Les règles de 3R (réduire, raffiner, remplacer) seront respectés pour cette étude.

**8680** Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune (pathologie au cours de laquelle le système immunitaire réagit contre l'organisme) rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois lié à des facteurs génétiques. Ainsi, une mutation hétérozygote du gène ERN1, conduisant à une perte de fonction partielle de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints de lupus. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une autoimmunité, nous étudions un nouveau modèle transgénique murin portant la mutation d'Ern1 équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle va nous offrir l'opportunité d'effectuer des investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'autoimmunité lorsque cette mutation s'exprime, et d'explorer les mécanismes de production d'autoanticorps.

Ce projet comprend 3 objectifs :

- I. Etudier le phénotype des souris mutées, à l'état basal (phénotype des cellules immunitaires et développement d'une autoimmunité), en comparaison à des souris contrôles,
- II. Etudier la réponse anticorps chez les souris mutées, en comparaison à des souris contrôles,

III. Etudier les mécanismes de la production d'autoanticorps chez des souris issues du croisement entre les souris mutées et un modèle transgénique murin (56R) permettant de suivre facilement les cellules produisant les autoanticorps, d'une part, et avec un autre modèle transgénique favorisant le développement d'une autoimmunité (B6 lpr/lpr), d'autre part.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée.

Nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque question posée, ce qui est minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques, soit 240 souris pour le projet global.

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées en groupes sociaux, et dans des cages comportant des enrichissements (nids, barreaux).

De plus, avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier les réponses immunes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à l'utilisation de lignées cellulaires (cellules non primaires) *in vitro*. En ce qui concerne les modèles *in vivo*, la souris est le modèle approprié afin d'étudier les fonctions du système immunitaire, car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'immunité et de l'autoimmunité.

Ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de développement d'une autoimmunité, et à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients.

**8681** L'anaphylaxie est une réaction allergique grave, aiguë qui peut causer la mort. Elle survient lorsqu'une personne allergique est exposée à son allergène particulier (substance capable de provoquer une réaction allergique) tels que des aliments, les piqûres d'insectes, certains médicaments ou le latex. Les symptômes peuvent être cutanés, respiratoires et cardiovasculaires et peuvent mettre la vie en danger. Les mécanismes de l'anaphylaxie mettent en jeu la production par l'organisme d'anticorps de type IgE qui se lient et leurs récepteurs spécifiques FcεR1 présents sur certains globules blancs (mastocytes et basophiles), conduisant à la libération en quelques minutes de puissants médiateurs dont l'histamine et le Platelet-Activating Factor (PAF), à l'origine des manifestations cliniques observées. Si le rôle des mastocytes et basophiles dans l'anaphylaxie a bien été caractérisé, peu d'études concernent les plaquettes sanguines. Nous souhaitons évaluer le rôle des plaquettes sanguines dans l'anaphylaxie aux IgE.

La compréhension de tels mécanismes nécessite l'utilisation d'un modèle expérimental d'anaphylaxie chez la souris, faisant intervenir les IgE, afin de pouvoir réaliser des analyses d'échantillons (organes, sang, lavages broncho-alvéolaires.). On examinera dans ces échantillons, le niveau d'activation des cellules sanguines (plaquettes, globules blancs), l'infiltration des globules blancs dans les organes ainsi que la formation d'œdèmes. Ces travaux nous permettront de déterminer si les plaquettes sanguines jouent un rôle dans l'anaphylaxie, et d'identifier ce rôle et, le cas échéant, de déterminer si les plaquettes pourraient constituer une nouvelle cible d'intérêt pour inhiber la réaction d'anaphylaxie.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post-test Bonferroni sera réalisée entre les groupes. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Après l'induction de l'anaphylaxie, les souris sont replacées dans leur cage d'origine et surveillée en continu pendant 1 heure. Lors de la procédure d'injection intraveineuse (rétroorbitaire), les souris sont anesthésiées au vetflurane® et maintenues au chaud à 37°C sur une plaque chauffante

thermostatée. Une goutte d'antalyre, un collyre anti-inflammatoire contenant de l'acide salicylique et de l'acide borique est ensuite appliqué sur l'œil de l'animal.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études in vitro sur cellules (tests d'activation cellulaire).

Ce projet nécessitera 984 souris au maximum.

**8682** Les plaquettes sanguines arrêtent les saignements suite à une lésion vasculaire, un processus physiologique que l'on appelle hémostase primaire. Un processus similaire peut survenir dans des conditions pathologiques dans une artère malade et entraîner la formation d'un thrombus occlusif qui est responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde. Les mécanismes impliqués dans la formation d'un thrombus occlusif et notamment l'importance de la taille de la lésion, restent très mal compris. Le but central de ce projet est de mieux comprendre la formation d'un thrombus occlusif : i) déterminer la formation du thrombus occlusif en fonction de la taille d'une lésion ; ii) comprendre la formation d'un thrombus occlusif et non-occlusif en étudiant différents paramètres comme l'état d'activation des plaquettes et la génération de fibrine.

Réduction

Les modèles de thrombose in vivo utilisés dans cette étude sont bien maîtrisés au laboratoire, déjà décrits et publiés. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 10, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces choix permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Remplacement

Une première partie de l'étude a été réalisé avec du sang humain en utilisant un modèle de thrombose ex vivo, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques de petite taille couplées à un système de microscopie. Des expériences ont été réalisées à partir de sang issu d'un donneur volontaire afin de caractériser in vitro l'importance de différentes tailles de lésion mimées par des zones recouvertes de collagène de différentes tailles. L'utilisation de ce système s'avère toutefois insuffisant, car le système d'aspiration ne reproduit pas la complexité de l'écoulement sanguine. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données in vivo seront nécessaires.

Un total de 300 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

**8683** L'ataxie de Friedrich (AF) est une maladie génétique, incurable à ce jour, affectant 1 personne sur 30 000.

L'AF est causée par une mutation du gène frataxine (Fxn) et à la diminution drastique du niveau cellulaire en protéine FXN, à un niveau résiduel d'environ 5 à 30% du niveau normal. Cependant, si la diminution du niveau cellulaire en FXN est présente dans toutes les cellules, les principaux organes/systèmes affectés sont les systèmes nerveux et le cœur.

Les patients souffrant de l'AF développent une perte de l'équilibre, de la coordination des mouvements et ensuite de la motricité qui les confinent dans un fauteuil roulant. La très grande majorité des patients (>80%) développent aussi des symptômes cardiaques plus ou moins sévères et précoces, qui sont responsables de leur décès précoce pour 60% d'entre eux.

Notre équipe a développé un premier modèle de souris transgénique dans lequel le gène *Fxn* est inactivé complètement dans les cellules musculaires striées. Ceci inclut le muscle cardiaque, mais aussi les muscles squelettiques, respiratoires et digestifs. De ce fait, ce modèle souris, dit MCK, développe une atteinte cardiaque similaire à celle observée chez les patients AF, mais aussi des atteintes des muscles squelettiques, respiratoires et digestifs. Or ces derniers ne sont pas présents chez les patients AF et sont artefactuels à la pathologie humaine. En outre, ces atteintes non cardiaques se manifestent de façon très sévère chez la souris à partir de la 15<sup>ème</sup> semaines d'âge, ce qui limite leur espérance de vie, même lorsque l'atteinte cardiaque est complètement corrigée. En effet, notre équipe développe actuellement une approche innovante de thérapie génique *in vivo*, à l'aide d'un virus recombinant inactivé et porteur d'une copie fonctionnelle du gène *Fxn*. Lorsque ce virus recombinant thérapeutique est administré chez les souris MCK par voie intraveineuse, celui-ci cible efficacement les cellules cardiaques où il libère le gène *Fxn* médicament et permet la réexpression de la protéine FXN. Cependant, si ce virus thérapeutique cible efficacement le muscle cardiaque et permet de corriger les atteintes cardiaques, il n'en ait pas de même pour les muscles squelettiques, respiratoires et digestifs. De ce fait, il est impossible garder en vie et suivre à très long terme, ces souris MCK traitées et corrigées pour l'atteinte cardiaque. Or le suivi à long terme (au-delà de 6 mois) est crucial pour valider l'efficacité, la persistance et l'innocuité de notre traitement. L'objectif du protocole d'expérimentation animal est de générer une lignée de souris transgénique avec une inactivation du gène *Fxn* spécifiquement et uniquement dans les cellules cardiaques, et pas dans les autres muscles striés. Ceci permettra (1) l'étude plus précise des mécanismes pathophysiologiques responsables des atteintes cardiaques, (2) l'identification de biomarqueurs cardiaques dans le sang et les urines et (3) la finalisation du développement préclinique de notre protocole de thérapie génique cardiaque, en particulier pour des évaluations à long terme. Cette étude inclura au total 308 souris, dont 110 à phénotype délétère et 198 à phénotype non délétère ou asymptomatiques. Nous appliquons ici le principe des 3R de l'expérimentation animale. D'une part, nous avons réduit le nombre de souris total, (1) en réalisant sur les mêmes cohortes expérimentales, plusieurs protocoles d'analyse longitudinale *in vivo* de la fonction cardiaque, (2) en réalisant aussi une partie des analyses histologiques et moléculaires sur ces mêmes cohortes et (3) en déterminant les effectifs minimums afin d'atteindre une puissance statistique suffisante. D'autre part, nous avons raffiné les procédures expérimentales (1) en appliquant d'une part une anesthésie gazeuse au cours des procédures expérimentales quand cela est possible et d'autre part les standards d'hébergement et d'enrichissement environnementale de façon systématique, afin de limiter la souffrance et l'anxiété animale, (2) en définissant une série de points limites afin de ne pas soumettre les souris à des souffrances éthiquement inacceptables. Finalement, nous avons confirmé qu'il n'existe pas à ce jour de modèle cellulaire cardiaque pouvant remplacer, ici, l'utilisation des modèles murins, afin d'étudier la cardiomyopathie associée à l'AF.

**8684** La sclérose en plaques (SEP) est une maladie dans laquelle la réponse immunitaire est altérée. Ceci engendre une atteinte de la gaine de myéline (démýélinisation) du système nerveux central, qui à terme conduit à une perte des fibres nerveuses et à un handicap irréversible chez les patients. Un des défis majeurs dans la SEP est de mieux comprendre les mécanismes de la démýélinisation. Pour atteindre cet objectif, il est important d'étudier des molécules clés comme les facteurs de transcription. Notre équipe a identifié un nouveau facteur, *Gcm2*, exprimé dans le système immunitaire. Nos récentes études suggèrent un rôle clé de *Gcm2* dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Nous proposons d'étudier le rôle de ce facteur de transcription dans une souris dans laquelle la protéine a été éliminée spécifiquement dans le système immunitaire. Cette approche innovante ouvrira la voie à une étude dans un modèle murin de la SEP et à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

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

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

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

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

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

**8685** La détection adéquate de modifications environnementales ou intracellulaires nécessite une expression et l'activation finement contrôlée de composants interconnectés de transduction du signal. Les Protéines kinases jouent un rôle clé au sein de ces systèmes en transférant des signaux vers leurs effecteurs en effectuant des réactions de phosphorylation. Parmi d'autres fonctions importantes, la transduction du signal dépendante de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) est principalement nécessaire pour contrôler l'inflammation et le métabolisme chez les vertébrés. Cependant une signalisation activée de manière chronique par des MAPK en réponse à un stress environnemental peut contribuer au développement de certaines pathologies, notamment métaboliques et inflammatoires.

Certaines voie de signalisation ont été identifiées comme étant des acteurs majeurs de la physiologie et pathologie de la corticosurrénale. Diverses anomalies génétiques, en particulier de certaines kinases telles que la PKA (protéine Kinase A), activent cette voie dans les tumeurs cortisoliques.

Les MAP kinases P38 sont des enzymes impliquées dans la régulation de différentes voies métaboliques, notamment liées au stress.

Les MAP kinases P38 (4 isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) sont synthétisées dans différents organes, en particulier la glande surrénale.

Ces 4 isoformes présentent des similarités mais ont des profils d'expression différents, ce qui suggère certaines fonctions spécifiques au niveau des différents organes.

Certaines lignées cellulaires corticosurréaliennes humaines ont été utilisées comme systèmes modèles de production d'hormones stéroïdiennes. L'implication des MAPKinases dans la production de ces hormones a été mise en évidence in vitro en particulier au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R.

Dans notre laboratoire, nous avons pu mettre en évidence in vitro que la lignée cellulaire corticosurrénaliennne humaine NCI-H295 produit spécifiquement la MAP Kinase p38 delta.

Nous souhaitons confirmer in vivo l'implication de cette kinase dans la synthèse des hormones stéroïdiennes produites par la glande surrénale.

Dans le cadre de notre projet, le laboratoire a généré un modèle de souris génétiquement modifiées, dans lesquelles le gène codant pour p38 delta est invalidée de manière globale. Ce modèle nous permettra d'approfondir la compréhension du rôle de cette kinase dans la régulation de la stéroïdogénèse surrénaliennne.

Pour approfondir l'étude du rôle de cette kinase, nous voulons mesurer les altérations métaboliques sur ces souris. Nous envisageons ainsi de placer des souris dans trois types de contextes physiopathologiques de stress (conduisant la glande surrénale à produire ces hormones) afin d'étudier le rôle de cette kinase dans la régulation de la stéroïdogénèse :

- le stress par le froid d'une part afin d'étudier plus spécifiquement le rôle de la kinase p 38 delta dans la régulation de la stéroïdogénèse glucocorticoïde

- le stress induit par une contention afin d'évaluer le rôle de la P38 delta dans la régulation de la stéroïdogénèse glucocorticoïde lors d'un stress aigu.

- un régime dit "high salt" d'autre part afin d'étudier plus spécifiquement le rôle de la kinase p 38 delta dans la régulation de la stéroïdogénèse minéralocorticoïde.

Nous prévoyons d'utiliser 12 animaux mutés et 12 animaux contrôles par protocole, soit 36 animaux mutés et 36 animaux contrôles, donc un total de 72 en tout.

L'utilisation des souris dans ce projet se justifie par la nécessité d'être à l'échelle d'un organisme pour l'étude de la kinase p38 delta dans un contexte de stress.

Le nombre d'animaux testé dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique fiable entre les différents groupes (tests non paramétriques de Mann-Whitney).

Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié, un anesthésique local sera appliqué avant prélèvement sanguin.

**8686** Les voies et mécanismes de transmission de la tuberculose bovine au sein des cheptels restent inconnus dans environ 30 à 40 % des exploitations touchées. La détection moléculaire de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) dans des prélèvements environnementaux (eaux, sédiments) issus de pâtures suspectées d'être à l'origine de la contamination de bovins en Côte d'Or suggère fortement que des matrices environnementales peuvent être une source de contamination commune pour les populations d'animaux. La détection moléculaire de *M. bovis* dans la faune sauvage (excrétas de blaireaux et de sangliers) et les sols de terriers de blaireaux à des niveaux élevés conforte cette hypothèse. Néanmoins le pouvoir infectieux de ces prélèvements reste à démontrer : en effet ce sont seulement des acides nucléiques de *M. bovis* qui ont été mis en évidence. Afin de tester le caractère infectieux de ces échantillons nous disposons du modèle murin sensible, C3HeB/FeJ, pour lequel nous avons montré qu'il était capable de reproduire la physiopathologie de la tuberculose bovine avec la formation de lésions similaires à celles observées chez le bovin naturellement infecté.

Le but de ce projet est d'évaluer le caractère infectieux de matrices environnementales : eaux, sols de l'environnement des bovins (autour des nourrisseurs et pierres à sel par exemple), de sols de terriers de blaireaux ou d'extraits de latrines (fèces) ainsi que leur rôle comme vecteur de *M. bovis* en utilisant un modèle animal sensible. La lignée de souris C3HeB/FeJ est propice à l'étude de la tuberculose. Ce modèle sera utilisé dans des essais d'infection expérimentale pour démontrer le caractère infectieux de ces matrices. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 300 souris C3HeB/FeJ dans le respect de la règle des 3R.

Nous veillons à appliquer la règle des 3R :

- Nous sommes capables de reproduire partiellement ces mécanismes in vitro avec des modèles cellulaires notamment pour la phase aiguë. Cependant pour la phase chronique de l'infection, seul le modèle in vivo est pertinent. Il n'existe aucune méthode permettant de démontrer l'innocuité de ces matrices autre qu'in vivo (Remplacer)

- Nous utilisons des tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs (test de petits effectifs type Mann-Whitney ou Bonferroni). Nos groupes expérimentaux sont donc de 5 animaux de même âge et même sexe (Réduire).

- Nous réduisons et limitons au maximum l'inconfort et la douleur pouvant être subie par les animaux. Le contact entre les animaux est maintenu et un enrichissement du milieu est effectué avec ajout de d'une feuille de papier absorbant (cellulose neutre : « sopalin ») qui n'interfère pas avec la bonne conduite des expérimentations et le suivi des animaux (bonne visibilité des animaux). Les souris sont hébergées en animalerie A3, en atmosphère contrôlée, à raison de 5 souris maximum par cage (vie en groupe) avec visite des animaliers 2 fois par jour. Les animaux sont suivis quotidiennement pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites. Pour la pose des puces, une anesthésie générale à l'isoflurane 4% est réalisée. Afin de minimiser la douleur de l'injection de la puce, un dépôt de prilocaïne 5% est fait 30 minutes avant l'injection de la puce. Pour la procédure d'instillation intranasale, les souris sont anesthésiées par injection par voie intra- péritonéale (Xylazine 5mg/kg-kétamine 50mg/kg) afin de limiter la douleur et de bien réaliser l'inoculation (Raffiner).

**8687** Le système immunitaire a pour mission de combattre l'invasion par des pathogènes quelle que soit la localisation de l'infection. Pour cela, les cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques vont agir comme des sentinelles et donner l'alerte en détectant l'intrusion de tout corps étranger. Ces sentinelles vont induire une réponse locale visant à éliminer l'agent étranger mais vont également alarmer d'autres effecteurs plus spécifiques comme les lymphocytes en migrant via la lymphe vers des postes d'alerte constitués par les ganglions lymphatiques (GL). Ces GL sont dispersés dans notre corps et drainent la lymphe provenant de leur environnement proche, sondant ainsi l'état des tissus voisins. Ils sont également le lieu de transit des lymphocytes qui représentent près de 95% de leur contenu cellulaire. Les cellules stromales qui constituent la structure de ces organes représentent donc moins de 5%. Elles jouent pourtant un rôle majeur en organisant la logistique de la réponse immunitaire en fournissant l'infrastructure, la convergence de l'information et en rassemblant les différents types cellulaires nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire. Les projets développés au sein de notre équipe visent d'une part à caractériser les macrophages

présents dans différents tissus et d'autre part à comprendre plus finement le rôle que jouent les cellules stromales lors d'une réponse immunitaire.

Les macrophages sont des cellules très plastiques dont le phénotype varie en fonction de leur localisation et du contexte physiologique ou pathologique. Ces cellules initialement décrites comme des phagocytes permettant d'éliminer les débris cellulaires, les cellules mortes et les pathogènes, assurent différentes fonctions qui en font à la fois des acteurs majeurs de la réponse immunitaire et de l'homéostasie tissulaire. Bien que ces cellules aient été identifiées il y a plus de 100 ans, de nombreuses questions concernant leur phénotype, leur origine ou encore leur renouvellement au sein des tissus restent ouvertes. Plusieurs études ont montré que la manipulation des macrophages au cours de certaines pathologies comme le cancer notamment avait un impact majeur sur l'évolution de la maladie. Décrire et comprendre comment fonctionnent les différents sous types de macrophages constituent donc une étape essentielle dans le développement de nouvelles thérapies ciblées. La nature plastique des macrophages selon leur localisation ou selon l'état du tissu qu'ils colonisent nous oblige à conduire une grande partie des expériences in vivo.

Les cellules stromales des GL incluent différents types cellulaires parmi lesquels les cellules endothéliales (vasculaires ou lymphatiques), les cellules fibroblastiques et les péricytes. À ce jour, nous ne connaissons que très peu de choses sur ces cellules stromales. Ce manque de connaissance réside principalement dans la nature de ces cellules : elles sont rares, fragiles et assemblées en réseaux tridimensionnels que l'on ne sait pas reproduire in vitro. De plus, ces cellules perdent rapidement leur phénotype et leur fonction lorsqu'elles sont cultivées in vitro. En conséquence, leur isolement des tissus lymphoïdes est difficile et leur étude in vitro largement biaisée, nous obligeant à étudier ces cellules in vivo.

Notre laboratoire a donc mis au point différentes stratégies et modèles expérimentaux murins pour étudier les macrophages et les cellules stromales in vivo. Les modèles murins que nous avons développés nous permettent d'adresser des questions similaires dans plusieurs organes et donc un même animal pourra être étudié dans le cadre de différents projets du laboratoire. Par ailleurs, dès que nous en avons la possibilité, des modèles in vitro sont mis en place. Les animaux sont hébergés dans des conditions qui respectent la directive 2010/63/UE (surface des cages; matériel pour confectionner des nids; Température/Hygrométrie/Photopériode contrôlées) et la douleur potentielle des animaux engendrée par les manipulations est systématiquement prise en compte en mettant en place des protocoles d'atténuation de la douleur (anesthésique ou antalgique). En conclusion, la mise en œuvre de nos projets respectera la règle des 3Rs.

Estimation du nombre total de souris utilisées pour le projet : 1120

**8688** Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex : sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

Le but de notre projet est de tester l'efficacité in vivo d'une molécule BFP999A05 présentant in vitro des propriétés anti-biofilm. Cette étude sera menée dans un modèle in vivo d'infection à *Staphylococcus aureus* sur cathéter chez la souris Balb/C (modèle bien maîtrisé au sein de l'équipe). Au total 168 animaux seront utilisés.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, compte tenu de l'expérience acquise sur ce modèle et de la reproductibilité des résultats, le nombre d'animaux par point sera de 7 au lieu de 10, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux de l'étude. En revanche, même si des expériences préalables ont pu être menées in vitro, une étude in vivo est nécessaire et aucune alternative de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, la procédure chirurgicale

impliquant les animaux est réalisée sous anesthésie générale et a fait l'objet de différentes améliorations afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance quotidienne sera également réalisée pour cette étude.

**8689** Les personnes souhaitant pratiquer la chirurgie sur animaux de laboratoire doivent suivre une formation réglementaire.

La formation comprend différents modules théoriques (organisation d'un laboratoire de chirurgie expérimentale, conception des procédures chirurgicales, choix et entretien du matériel, asepsie opératoire, préparation des animaux et du personnel) complétés par des travaux pratiques (techniques de base en chirurgie, hémostase, sutures, pansements, soins ; techniques spécifiques selon la spécialisation de la formation.

Ce projet décrit les travaux pratiques d'une formation réglementaire à la chirurgie dont la demande d'approbation est soumise à la commission nationale sur l'expérimentation animale.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable à la formation aux techniques chirurgicales de base et plus spécifiques. Tous les animaux seront utilisés après avoir reçu un antalgique et avoir été anesthésiés très profondément. Ils seront finalement euthanasiés avant leur réveil.

Ces travaux pratiques contribueront au raffinement des pratiques des candidats suivant la formation. Tous les animaux utilisés pendant les travaux pratiques seront des animaux de réforme d'élevage. Plusieurs techniques chirurgicales seront enseignées sur chaque animal pour réduire le nombre d'animaux utilisés.

Au total, 390 souris et 75 rats seront utilisés sur 5 ans pour la formation de stagiaires, dans deux procédures sans réveil.

**8690** Le nombre de victimes de traumatisme crânien, souvent causé par un accident de la route, une pratique sportive ou une chute, se chiffre en millions de personnes. Durant cette dernière décennie, le nombre de victimes est en augmentation permanente. Suite à un traumatisme, de nombreuses personnes décèdent ou ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapées. Il est apparu qu'un grand nombre de victimes présentent des troubles chroniques tels que des déficits mnésiques, un état dépressif, un comportement anxieux etc, ce qui perturbe fortement leur vie quotidienne. Les processus mnésiques ainsi que les états émotionnels sont sous tendus par l'hippocampe, une structure vulnérable lors d'un traumatisme crânien même si elle n'est pas directement impactée.

Il est maintenant bien établi qu'au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. Ces neurones sont impliqués dans l'apprentissage spatial mais jouent également un rôle clé dans la régulation des émotions.

L'objectif du projet est d'étudier les déficits (mnésique et d'ordre émotionnel) apparus suite à un traumatisme crânien et de voir si la manipulation de la neurogenèse permettrait de pallier ces troubles. Nous avons émis comme hypothèse de travail que la neurogenèse pourrait être impliquée dans la récupération fonctionnelle et donc être bénéfique pour les processus dépendants de l'hippocampe.

Puisque ce projet se repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal, une approche in vitro, ou in silico, ne peut être envisagée. Pour réaliser notre projet, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin (la souris) de traumatisme crânien. Nous évaluerons dans un premier temps les déficits à court (1 mois) et long terme (5 mois) causés par un traumatisme crânien. Puis dans un second temps, nous évaluerons le rôle des neurones néo-formés. Les souris seront évaluées dans une batterie de tests comportementaux (évaluation de la mémoire spatiale, de l'apprentissage, mesure de l'anxiété.) dépendants de l'hippocampe 1 mois (le temps de la maturation des neurones) et 5 mois après le traumatisme crânien. Pour ce projet nous utiliserons un total de 306 souris mâles, âgées de 10 semaines. Le projet s'applique à réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes animaux dans différents tests comportementaux lorsque cela sera possible. De plus, les séquences comportementales seront organisées de façon à réduire au maximum l'inconfort des animaux. Par ailleurs, nous veillerons à ce que le bien-être des animaux soit privilégié, nous mettrons en place un suivi des animaux permettant de limiter et traiter leur éventuelle



souffrance. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies jusqu'à l'induction du traumatisme crânien où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (carrée de coton).

**8691** Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les affections cornéennes sont responsables de 1,5 à 2 millions de nouveaux cas de cécité unilatérale dans le monde chaque année. Le seul traitement envisageable pour les patients atteints est la greffe de cornée « de pleine épaisseur » ou kératoplastie transfixiante. En France, 4000 greffes de ce type sont ainsi réalisées tous les ans.

Depuis les années 1970, plus de 450 cas de transmission accidentelle de la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (MCJs), lors d'actes médicaux ou chirurgicaux (transmission iatrogène), ont été décrits. Parmi ces cas, certains concernaient des patients ayant reçu une greffe de cornée provenant d'individus en incubation de MCJs. Toutefois, un lien causal direct entre la transplantation cornéenne et le développement de la maladie n'a pu être clairement établi que dans un seul cas. Dans les autres cas, qualifiés de « possibles », le diagnostic de MCJs n'a pas pu être confirmé définitivement (par analyses histologiques) à la fois chez le donneur et chez le receveur. Par ailleurs, les rares données expérimentales concernant le pouvoir infectieux de la cornée chez les individus atteints de maladies à prion sont incomplètes, voire équivoques.

Dans ce contexte, la validation d'un modèle permettant l'évaluation des risques de transmission de prions lors de greffes de cornées apporterait une aide précieuse aux autorités chargées de l'élaboration des règles sanitaires applicables aux transplantations cornéennes et aux banques de cornées. En l'absence de modèle *in vivo* ou *ex vivo* pertinent, nous proposons dans ce projet un modèle ovin, car cette espèce possède plusieurs avantages, liés à des particularités physiques et épidémiologiques :

- il existe chez les ovins une maladie à prion naturelle, la tremblante classique, dont l'agent a une dissémination large dans l'organisme

- le gabarit moyen et la taille du globe oculaire d'un mouton sont similaires à ceux d'un humain, ce qui permet la réalisation de greffes de cornée dans des conditions similaires (taille du greffon notamment) à celles rencontrées en chirurgie humaine

L'expérimentation se déroulera en 2 étapes :

1/ Etude de la cinétique de dissémination des prions dans la cornée. Pour cela, 3 groupes de 5 moutons seront euthanasiés par injection intraveineuse, respectivement 60, 90 et 160 jours après avoir été inoculés par voie orale avec une souche de tremblante. Le pouvoir infectieux de leur cornée totale et des 3 couches anatomiques la composant (épithélium, stroma, endothélium) sera testé par inoculation intracérébrale à des souris transgéniques porteuses du gène codant la protéine prion cellulaire ovine. Six souris seront inoculées avec chaque échantillon, soit 24 souris/ovin (6x4), afin de permettre une comparaison statistique des durées d'incubation moyennes observées dans chaque lot.

2/ Evaluation du risque de transmission directe (par un greffon contaminé) et indirecte (par l'intermédiaire d'instruments chirurgicaux contaminés) des prions lors de greffe unilatérale de cornée. Pour cela, 3 groupes de 5 ovins sains ("receveurs") seront transplantés avec la cornée des ovins ("donneurs") des 3 groupes expérimentaux de l'étape 1. Un groupe supplémentaire, constitué de 5 moutons sains qui subiront une autogreffe à l'aide d'instruments préalablement contaminés lors des interventions chirurgicales précédentes, sera également inclus dans l'étude.

Au total, ce projet nécessitera donc l'utilisation de 35 ovins (15 à l'étape 1 et 20 à l'étape 2) et de 360 souris (étape 1 : 24 souris inoculées/ovin,  $24 \times 15 = 360$ ).

Les souris seront hébergées, en groupes de 6, dans des cages teintées équipées de bûchettes à ronger et de coton pour la confection de nids. Les inoculations intracérébrales seront réalisées sous anesthésie générale.

Les ovins seront logés dans des boxes paillés de 9 m<sup>2</sup>, accueillant chacun 5 animaux. Les greffes de cornée seront effectuées sous anesthésie générale, complétée par une anesthésie oculaire et l'administration d'un antalgique par voie générale.

Les suivis cliniques post-inoculation et post-opératoire seront assurés par une équipe de quatre vétérinaires. Les animaux déclarant une tremblante clinique seront euthanasiés en cours d'expérimentation alors ceux ne développant aucun symptôme seront euthanasiés 200 jours après inoculation (souris) ou 300 jours après la transplantation cornéenne (ovins). Sur ces derniers, des

prélèvements d'organes seront réalisés postmortem afin de mettre en évidence une éventuelle dissémination du prion dans leur organisme malgré l'absence de maladie clinique.

**8692** La séparation maternelle précoce (SMP) est un stress postnatal permettant de reproduire la symptomatologie de la prématurité observée en clinique. Nous avons observé que les animaux adultes ayant été au préalable exposés à cette perturbation néonatale présentaient une hypersensibilité à la douleur comparativement aux animaux contrôles ainsi qu'un comportement social plus réduit et une anxiété accrue. De nombreuses études ont montré le rôle de l'ocytocine (OT) dans la régulation des comportements sociaux, du comportement maternel et dans les contrôles de la douleur. Le système ocytocinergique est donc un candidat de choix pour tenter d'expliquer les comportements atypiques des animaux ayant subi cette séparation maternelle à la naissance. En outre, cette étude fait suite à un précédent projet de recherche de l'équipe ayant démontré un défaut de fonctionnement de l'analgésie portée par l'OT dans des situations de stress non douloureux chez les animaux ayant été séparés de leur mère à la naissance. Cependant, les mécanismes sous-tendant ce dysfonctionnement du système nociceptif ne sont pas connus. De ce fait, nous étudierons ici l'implication des neurones nociceptifs de deux régions : ceux présents dans les ganglions rachidiens dorsaux et ceux de la moelle épinière. Compte-tenu du rôle de l'OT cutanée dans la modulation de l'influx nociceptif, nous étudierons également l'impact de l'OT sur le fonctionnement de ces neurones dans ce modèle de prématurité, dans le but de mettre en évidence des cibles thérapeutiques potentielles. Les travaux se dérouleront sur trois ans et utiliseront 130 rats Wistar, soit 10 femelles gestantes et 120 animaux de la descendance. Ce nombre d'animaux permettra d'effectuer des analyses statistiques classiques démontrant l'effet de la séparation maternelle sur les données mesurées. Des groupes de 10 animaux permettront d'appréhender des différences statistiques lors de l'utilisation des tests statistiques appropriés. La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : (i) Raffinement par un hébergement en cages collectives enrichies (nid + bâtons) après sevrage et maintien des fratries après séparation selon les sexes, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères. Ce projet comporte une procédure invasive qui sera réalisée sous anesthésie et la température de l'animal sera maintenue via un tapis chauffant thermostaté durant toute la procédure (ii) Réduction : le nombre d'animaux sera réduit par une utilisation des portées dans leur ensemble sans tenir compte du sexe biologique dans un premier temps. Un avenant sera apporté si un éventuel effet sexe-spécifique devait être suspecté pour analyser séparément les mâles et femelles, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. (iii) Remplacement : le projet portant sur la nociception qui est un processus intégré, il est en revanche impossible à ce jour de se passer de sujets vivants dotés d'un cortex développé.

**8693** Le nombre de personnes atteintes d'hépatites, notamment les hépatites fulminantes, est de plus en plus associé à la prise de médicaments qu'elle soit intentionnelle ou accidentelle. L'hépatite fulminante est associée à une destruction des cellules du foie conduisant au décès quasi systématique du patient. Parmi les médicaments impliqués, le paracétamol (ou acetaminophène) représente, dans les pays développés, la cause majeure de décès liés à une hépatite fulminante. En France, les enfants de 1 à 4 ans sont les plus sujets aux intoxications accidentelles, alors que les 10 à 19 ans représentent une classe d'âge où les tentatives de suicide sont les plus conséquentes. Aux Etats-Unis ou en Grande Bretagne, le paracétamol représente un véritable enjeu de santé publique, notamment pour les sujets jeunes. En effet, aux Etats-Unis, le paracétamol est responsable d'environ 80 000 consultations aux urgences, 30 000 hospitalisations et 500 décès par an. La NAC (N-Acétylcystéine) est le seul antidote administré aux patients qui sont intoxiqués par le paracétamol. Cependant, l'effet protecteur de la NAC est dépendant du temps écoulé entre le traitement et l'overdose au paracétamol. De plus, de fortes doses de NAC sont nécessaires puisqu'elle possède une faible absorption ce qui augmente le coût du traitement de manière importante. En outre, l'utilisation de concentrations importantes de NAC sur une période de temps longue est associée à de nombreux effets secondaires. Par conséquent, le développement d'un antidote plus efficace, avec

une période de traitement courte et qui serait moins onéreuse serait d'un grand intérêt pour une meilleure prise en charge des patients intoxiqués aux médicaments dont le paracétamol.

La protéine HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter factor) et son récepteur cellulaire, MET, jouent un rôle essentiel dans la régénération des tissus et plus particulièrement la régénération du foie. La protéine NK1 qui est un dérivé de l'HGF/SF est capable d'activer le récepteur MET. A l'inverse, une partie de l'HGF/SF, appelée domaine K1 ne présente qu'une très faible activité. Le développement de dérivés de l'HGF/SF peut avoir un grand intérêt en médecine régénérative, cependant, l'utilisation de l'HGF/SF ou de NK1 présente de nombreuses limitations. En effet, la synthèse de l'HGF/SF montre quelques difficultés. De plus, l'HGF/SF et NK1 sont sensibles à la dégradation et possèdent une faible diffusion aux tissus. Dans le but de produire de nouvelles molécules capables d'activer le récepteur MET et de s'affranchir des nombreuses limitations associées à l'utilisation de l'HGF/SF ou de NK1 en thérapeutique, un excellent dérivé de l'HGF/SF a été généré et active correctement le récepteur MET. En effet, il est capable de protéger les souris d'hépatites fulminantes induites par une drogue non médicamenteuse. Afin d'avoir une application plus réaliste, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité de notre dimère sur un modèle d'hépatite fulminante induite par une intoxication à différents médicaments dont le paracétamol. Nous avons pu mettre en avant, en utilisant un modèle in vitro de cellules foie, que le dérivé de l'HGF/SF est capable d'empêcher la mort induite par le paracétamol et ce de manière plus conséquente que la NAC. Au vu des résultats intéressants obtenus dans les cellules, il nous semble important de les confirmer in vivo et de vérifier si le dérivé de l'HGF peut être une molécule intéressante pour une meilleure prise en charge des patients intoxiqués et qui présentent des hépatites médicamenteuses qu'elles soient ou non fulminantes. Pour ce faire, 309 souris seront nécessaires pour obtenir des résultats robustes qui viendront confirmer les différents résultats obtenus in vitro. Nous utiliserons un nombre plus restreint de souris puisque les mises au point ont été réalisées sur les cellules. Le modèle de souris permettra de venir confirmer l'action du dérivé de l'HGF/SF sur un organe entier en prenant en compte les propriétés d'absorption et d'élimination du paracétamol et aussi la diffusion et l'efficacité du dérivé de l'HGF/SF. Au cours des expérimentations, les souris seront suivies toutes les heures afin d'évaluer leur bien-être, ainsi, toute souris présentant des signes de détresse (difficulté respiratoire, prostration, baisse de la vivacité) sera euthanasiée.

**8694** Notre projet a pour but de comprendre les mécanismes cellulaires aboutissant au développement de lésions rénales après radiothérapie. Certains patients atteints de cancer comme des leucémies ont besoin de recevoir une greffe de moelle osseuse. Préalablement à cette greffe, une irradiation corporelle totale est nécessaire afin de détruire les cellules tumorales. Ces patients traités par radiothérapie peuvent développer, dans certains organes, des séquelles liées à l'irradiation et notamment des lésions au niveau des reins.

L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle d'un phénomène particulier appelé « sénescence » (qui correspond à un vieillissement cellulaire prématuré) dans l'initiation et le développement des lésions radio-induites rénales. Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes nous devons utiliser des modèles expérimentaux pré-cliniques in vivo. La lésion tissulaire sera réalisée soit après une irradiation corporelle totale soit après une irradiation localisée d'un rein. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. Plus particulièrement, nous utiliserons des souris transgéniques qui expriment le gène de la luciférase dans les cellules en cours de sénescence. Après l'irradiation, les souris seront suivies chaque mois par imagerie, sous anesthésie générale, afin de visualiser l'apparition des cellules sénescents au cours du temps.

Cette étude, prévue sur 3 ans, nécessitera ainsi l'utilisation de 60 souris.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables statistiquement. De plus, nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet, est mise en place pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence et son comportement, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, les résultats de ce projet devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la détérioration rénale suite à radiothérapie et pourrait permettre de développer des outils prédictifs et thérapeutiques.

**8695** La spasticité est une augmentation exagérée et permanente du tonus musculaire. Elle se traduit par une raideur musculaire persistante et des spasmes. La spasticité survient dans diverses pathologies, notamment en réponse à des lésions cérébrales, par exemple en cas de paralysie cérébrale (autrefois appelée "infirmité motrice cérébrale"). La paralysie cérébrale est la déficience motrice la plus courante chez l'enfant. Elle touche 17 millions de personnes dans le monde, et 125 000 en France. Elle résulte de lésions irréversibles survenues sur le cerveau du fœtus ou du nourrisson, dues à la destruction de cellules du cerveau en développement. La spasticité survient aussi mais lors d'immobilisations contraintes comme un alitement prolongé, des situations très communes, rencontrées dans de nombreuses pathologies. La spasticité est très handicapante car outre la raideur musculaire et l'exagération des réflexes, elle induit des douleurs parfois difficilement supportables. Chez l'animal, la spasticité peut être mise en évidence grâce à l'étude d'un réflexe appelé "réflexe de Hoffmann" ou réflexe H. Normalement, la réponse réflexe est diminuée quand des stimulations répétées sont appliquées, mais cette diminution est moindre dans le cas d'un muscle spastique. Le présent projet a pour objectif d'étudier ce réflexe dans deux modèles animaux classiquement utilisés au laboratoire.

Le premier modèle consiste à imposer une période de 14 jours de restriction sensorimotrice (SMR) à un rat adulte. Il reproduit les effets de différentes formes d'hypoactivité chez l'humain, telles qu'une immobilisation par plâtrage, un alitement prolongé, un vol spatial... Le second modèle est un modèle animal de paralysie cérébrale. A plus long terme, ces études permettront de développer de nouvelles stratégies de réhabilitation, par le biais notamment de traitements pharmacologiques.

**REDUCTION** : L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 122 rats. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

**RAFFINEMENT** : Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux, et en étant particulièrement vigilant sur les points limites.

**REMPLACEMENT** : Il s'agit d'un projet portant sur les effets de l'inactivité physique sur le fonctionnement du système nerveux central. Un tel projet de neurosciences intégratives ne peut être mené avec des méthodes alternatives in vitro ou in silico.

**8696** L'insulinome est une tumeur des cellules neuroendocrines pancréatiques rare, qui touche 1 patient / million d'habitants et par an. Elle est responsable d'une sécrétion inappropriée d'insuline qui se traduit par la survenue d'hypoglycémies. En dehors d'un traitement, celles ci sont de plus en plus fréquentes et de plus en plus sévères pouvant conduire au décès. Le traitement de l'insulinome est chirurgical avec résection de la lésion et parfois d'une quantité importante de parenchyme pancréatique sain associé selon la localisation. Le risque est de développer secondairement une insuffisance pancréatique avec apparition d'un diabète.

La photothérapie dynamique consiste à injecter par voie intraveineuse une molécule spécifique d'un type cellulaire couplée à un traceur pouvant être activé à l'aide d'un rayonnement adéquat pour induire une lésion de ces cellules. Dans le cadre de l'insulinome, les cellules bêta de l'insulinome seraient ciblées et l'insulinome serait détruit spécifiquement. Ceci constituerait une alternative thérapeutique intéressante en permettant une destruction de la tumeur sans toucher au pancréas sain, permettant un traitement moins invasif pour le patient avec des effets secondaires moins sévères.

L'insulinome exprime fortement le récepteur au Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Le couplage du traceur phototoxique à un analogue de ce peptide, l'exendine, permettrait de cibler spécifiquement les cellules de l'insulinome. Une molécule a été synthétisée, l'exendine 4-700DX, qui associe une molécule d'exendine, analogue de GLP-1 et une molécule d'IR-Dye 700DX, une molécule capable d'induire une lyse cellulaire après activation par un laser. Une étude intermédiaire utilisera

l'exendine4-800 CW, qui associe, à une molécule d'exendine 4, une molécule d'IR-Dye 800 CW, afin de confirmer la captation pancréatique spécifique dans les cellules bêta.

Le miniporc est anatomiquement et physiologiquement proche de l'homme en ce qui concerne son appareil digestif et en particulier son pancréas. D'autres études ont déjà utilisé cet animal comme modèle à la fois pour les îlots pancréatiques et pour l'exendine.

Le but de ce projet est de valider dans une étude préclinique avant essai expérimental chez l'homme l'efficacité et l'absence d'effets de notre traceur dans un protocole de photothérapie dynamique. Les avantages escomptés sont une destruction spécifique des cellules bêta. Les dommages escomptés sont une réaction du pancréas sain environnant, pouvant aller de la simple inflammation à une pancréatite.

Les différentes manipulations seront effectuées chez les animaux selon les principes des 3R :

1) Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à la plus petite quantité possible pour observer des résultats significatifs.

2) Remplacement : Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire, des études préliminaires ont été réalisées in vitro puis chez la souris, confirmant la bonne affinité du traceur pour le pancréas et une capacité à induire une lyse cellulaire dose-dépendante

3) Raffinement : Les animaux utilisés dans cette étude seront hébergés individuellement. Afin de limiter leur nombre, nous serons particulièrement attentifs à leur développement et à leur rétablissement en utilisant des traitements anti-douleurs avant, et pendant le geste.

Pour réaliser cette étude, nous estimons le nombre d'animaux nécessaires à 5 par groupe, 25 individus.

Les résultats obtenus permettront une meilleure compréhension des effets thérapeutiques et des effets secondaires avant l'utilisation chez l'homme.

## **8697** Contexte Médical, Social et Scientifique

Les conflits actuels impliquent fréquemment des lésions multiples chez les militaires et les brûlures atteignent 10% des blessés. En raison de sa fonction de barrière thermorégulatrice et immunitaire, la peau est un organe indispensable à la survie de l'organisme. Lors d'agressions importantes, telles qu'après une brûlure du troisième degré, la peau n'est plus capable de cicatriser spontanément et induit un déséquilibre physiologique parfois mortel. La prise en charge des victimes de brûlures sévères se base quasi-exclusivement sur l'utilisation de substituts cutanés produits en laboratoire : les Cultures d'Épidermes Autologues (CEA). Utilisées depuis plus de 40 ans, les CEA permettent de reformer efficacement la barrière cutanée. Pourtant, leur prise de greffe, leur fragilité, leur coût et les séquelles esthétiques et fonctionnelles qu'elles engendrent limitent leur utilisation thérapeutique. Dans ce cadre, un nouveau substitut épidermique produit en laboratoire sur une matrice spécifique a montré son efficacité dans de précédents tests in vivo en termes de prise de greffe et de reformation d'un épiderme sain.

### Description du Projet

Avant de pouvoir utiliser ce type de substituts en clinique, nous devons nous assurer que son utilisation in vivo n'induit pas la formation de tumeurs. Ce projet vise à vérifier que les cellules utilisées pour la formation de ce type de substituts épidermiques n'évoluent pas en cancer lorsqu'elles sont greffées in vivo. Les cellules seront injectées ou greffées sous forme de feuillets en sous-cutanée chez des souris nude en zone dorsale. Les animaux seront suivis quotidiennement pendant 3 mois pour vérifier l'apparition éventuelle de tumeurs.

### Conformité Ethique

La mise en œuvre de ce projet respecte la règle des 3Rs « Réduction, Raffinement, Remplacement ». Malgré l'existence de tests in vitro évaluant le potentiel des cellules à former des tumeurs, les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans l'apparition d'une tumeur in vivo diffèrent de ceux induits en laboratoire. Pour atteindre les objectifs du projet, l'utilisation d'un modèle d'étude chez l'animal ne peut donc pas être remplacée par une étude in vitro. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, un nombre minimal d'animaux conformément aux recommandations de la pharmacopée européenne est utilisé. De plus, un protocole expérimental conditionnel a été conçu afin d'éliminer les hypothèses non valables qui auraient nécessité plus d'animaux. Dans cette étude, le nombre d'animaux à inclure est de 220 souris maximum. Enfin, le bien-être des animaux sera

assuré par l'utilisation de moyens d'enrichissement du milieu de vie des animaux (abris, jeux à ronger), par une visite quotidienne, et par un traitement analgésique adapté en fonction de l'apparition de douleurs éventuelles. Dans le cas où la souffrance des animaux deviendrait inacceptable, des mesures de euthanasie seront appliquées.

**8698** Le but du présent projet, proposé par 4 centres partenaires d'un réseau national de plateformes dédiées à l'expérimentation animale, est de standardiser plusieurs procédures classiques du phénotypage métabolique de la souris, afin que les résultats soient comparables d'un centre de recherche à un autre. Ces procédures comprennent la mesure de la dépense énergétique couplée à la surveillance de la consommation de nourriture et de boisson, l'analyse de la composition corporelle, la mesure des marqueurs métaboliques plasmatiques et un test fonctionnel de tolérance au glucose (GTT).

Les procédures seront réalisées sur deux souches de souris qui présentent des résultats différents dans ces procédures : la C57Bl6/J, l'un des modèles de rongeurs utilisés dans les neurosciences et le métabolisme, et les souris compétentes en mélatonine C3HeB / FeJ.

Pour les conditions de base, chaque plateforme exposera les animaux à son propre régime alimentaire standard. Les souris seront ensuite nourries avec un régime riche en graisses commun pendant 12 semaines. Les différentes procédures seront effectuées avant et après le régime.

Ce projet nous permettra d'évaluer la reproductibilité entre centres et donc la robustesse de nos résultats pour le phénotypage des souris, ce qui est un pré-requis pour démarrer des projets de recherches communs sur différents sites.

Nous utiliserons au total 64 animaux pour ce projet. Les procédures seront réalisées dans le respect du bien être animal pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux (les souris seront hébergées par cages de 4, des carrés de ouate sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid et le cas échéant - agressivité -, des igloos seront ajoutés dans les cages). Un suivi quotidien des animaux sera assuré par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait.

**8699** Les pathologies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité à ce jour. Ces maladies résultent en grande partie de l'obstruction des artères suite à la rupture de plaque d'athérosclérose, dépôt de lipides, dans la paroi des vaisseaux sanguins. Dans le cœur, l'obstruction des artères coronaires entraîne une ischémie tissulaire et la mort des cellules contractiles, puis à plus long terme une insuffisance cardiaque. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes qui expliquent le développement de ces plaques d'athérosclérose dans les vaisseaux sanguins.

La réponse inflammatoire associée à l'athérosclérose joue un rôle majeur dans la survenue de celle-ci. Cette réponse inflammatoire implique de nombreuses cellules communiquant entre elles. Récemment les vésicules extracellulaires (VEs) ont été décrites comme un nouveau mode de communication.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, le rôle de ces vésicules extracellulaires (VEs) d'origine endothéliale susceptibles d'agir comme des messagers intercellulaires lors de l'athérosclérose. Pour cela, nous évaluerons 1- quelles cellules captent les VEs d'origine endothéliale et 2- quel est l'effet d'un tel transfert.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le processus inflammatoire associé à l'athérosclérose. L'analyse consistera à étudier la réponse inflammatoire et les lésions d'athérosclérose suite à des injections de VEs. Cette étude est prévue sur 3 ans et nécessitera au total 220 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. En effet, nos données in vitro nous ont déjà permis d'identifier certaines des cellules réceptrices. De plus des paramètres expérimentaux tels que le nombre d'animaux ou bien encore les durées de traitements ont déjà été déterminés par d'autres projets nous permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. Une première étape consistera à déterminer suite à l'injection de VEs à différents modèles murins quelle(s) cellule(s) captent les VEs d'origine endothéliale. Une fois déterminé quelles cellules captent les VEs, un modèle murin approprié mimant l'athérosclérose (mise

sous régime gras des animaux) sera injecté de façon bihebdomadaire avec des VEs pendant 6 semaines afin de déterminer les effets d'un transfert de VEs d'origine endothéliale sur les lésions d'athérosclérose et sur l'inflammation associée.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie et des traitements antalgiques sont prévus. Nous avons établi une grille d'évaluation des points limites, si ces paramètres sont atteints, une euthanasie anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliquant les vésicules extracellulaires dans le contrôle de l'inflammation associée à l'athérosclérose. Ces résultats pourraient permettre d'envisager dans le futur le développement de nouvelles thérapies

**8700** Le cancer du sein est une tumeur maligne qui peut se propager dans tout l'organisme : on dit alors que la tumeur a métastasé. Les cellules de cancer du sein migrent préférentiellement à l'os, ou elles vont être responsables d'une destruction massive de l'os, l'ostéolyse. Ceci génère de grandes douleurs et des fractures pathologiques et peut même engager le pronostic vital des patientes. A l'heure actuelle, les métastases osseuses sont incurables et les traitements sont donnés uniquement pour améliorer la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par le biais desquels les métastases dérivant d'un cancer du sein se forment afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

LOX et LOXL2 sont des enzymes qui permettent l'assemblage des fibres d'élastine et de collagène dans la matrice extracellulaire. Elles ont donc un rôle primordial dans la formation des tissus de soutien dans l'organisme. Elles sont aussi impliquées dans la formation des tumeurs et le développement métastatique. Ce sont aussi des marqueurs de mauvais pronostic dans de nombreux cancers dont le cancer du sein. Notre projet vise à comprendre comment LOX et LOXL2 favorisent la formation des métastases osseuses dérivant d'un cancer du sein. L'objectif majeur de ce projet est de déterminer les conséquences d'une déplétion de LOX et/ou de LOXL2 dans les mécanismes de migration, de colonisation et d'ancrage des cellules tumorales au site osseux chez la souris. Ceci sera rendu possible par l'injection des cellules tumorales avec ou sans LOX et/ou LOXL2 dans la circulation sanguine afin d'observer la formation des micro- et des métastases osseuses. Des résultats encourageant, *in vitro*, nous ont déjà permis d'observer une diminution de l'interaction entre les cellules cancéreuses déplétées en LOX ou LOXL2 et les cellules présentes dans l'os, mais aussi une diminution de l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire tel que le collagène et la fibronectine. Ce protocole permettra de confirmer ces données *in vivo* et permettra également d'apporter des arguments solides pour le développement d'inhibiteurs de ces enzymes à visé thérapeutique afin de prévenir et d'inhiber la dissémination et la croissance des cellules cancéreuses mammaires dans la moelle osseuse. A terme ce projet apportera des informations indispensables pour limiter la rechute métastatique des cancers du sein, donc améliorer la survie des patients.

Raffinement : Les souris cohabiteront par groupe de 5 dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) renouvelé une fois par semaine. Les animaux seront en cage à couvercle filtrant afin de les prémunir de tout risque infectieux. Afin de permettre l'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement, les souris seront placées en stabulation durant 10 jours au sein de l'animalerie d'accueil sous surveillance journalière. Tous les protocoles d'injection des cellules tumorales seront réalisés sur des souris anesthésiées au moment des injections. L'injection de certaines cellules étant susceptible de créer un cancer osseux, l'état de bien être des souris sera évalué quotidiennement par l'observation des principaux signes physiologiques, comportementaux et de l'apparence de l'animal. Les animaux seront pris en charge au premier signe d'inconfort.

Remplacement : L'influence que peuvent avoir LOX et/ou LOXL2 sur des phénomènes tumoraux tels que la migration, la colonisation et l'ancrage osseux lors de la formation des métastases ne peut pas être exclusivement appréciée par des tests *in vitro*. L'utilisation d'une lignée cellulaire d'origine humaine chez la souris permettra de reproduire le plus fidèlement possible un cas pathologique clinique (cancer du sein). De ce fait des souris femelles seront utilisées.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe expérimental contiendra un nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables, soit 10 animaux. Nous utiliserons des lignées de cancer du sein que nous avons préalablement testées

in vitro pour leur capacité à être invasives et à interagir avec les cellules de la niche osseuse. Sur les 5 ans nécessaires à la réalisation du projet, un nombre total de 480 souris sera nécessaire.

**8701** Le projet présenté ici a pour objectif de valider de nouveaux traitements anticancéreux pour l'ostéosarcome. L'ostéosarcome est une tumeur osseuse qui touche les enfants et les adolescents. Cette tumeur est particulièrement difficile à traiter puisqu'elle présente des résistances, innées et/ou acquises, aux thérapies conventionnelles. Pour ces raisons, de nouveaux traitements contournant ces mécanismes de résistance sont nécessaires. C'est pourquoi dans ce projet, nous proposons de tester de nouvelles approches thérapeutiques pour l'ostéosarcome. Afin de pouvoir utiliser ces traitements chez l'homme il est nécessaire de les valider auparavant dans des modèles cellulaires et animaux.

Cette étude in vivo fait suite à des études in vitro. La phase de validation par des tests in vitro est indispensable mais limitée car elle ne peut pas mimer le rôle du microenvironnement tumoral dans la progression et la réponse tumorale à un agent thérapeutique d'où le recours à des tests in vivo sur le petit animal.

Dans le projet présenté, nous allons valider l'efficacité de ce composé appliqué seul ou en combinaison avec des traitements conventionnels (chimiothérapies) dans un modèle PDX (Patient Derived Xenograft) d'ostéosarcome qui reproduit autant que possible l'évolution clinique de la maladie. En effet, le modèle d'ostéosarcome que nous allons utiliser a été obtenu à partir d'une tumeur humaine implantée chez la souris. Ce modèle PDX a été validé par des anatomopathologistes.

Afin d'obtenir des données statistiquement analysables, nous allons utiliser au maximum 155 souris réparties dans 3 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative quant à l'efficacité comparée des différents traitements.

Pour pouvoir comparer l'efficacité des différents composés, les traitements seront administrés deux fois par semaine aux souris des différents groupes expérimentaux. Les traitements seront poursuivis sur une durée de 3 à 4 semaines. Durant cette phase de traitements, nous suivrons l'évolution des tumeurs des animaux et pourrons ainsi voir quel traitement est le plus efficace à ralentir la progression tumorale.

Les traitements sont administrés par voie intrapéritonéale; nous prendrons soin de stresser au minimum l'animal. L'état général et le comportement des animaux seront suivis trois fois par semaine (au moment du change, ainsi qu'au moment de la mesure tumorale et de l'administration des composés). L'administration d'anesthésique, un suivi adapté des animaux et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

A l'issue de ce projet de recherche nous escomptons pouvoir valider de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des ostéosarcomes. La mise à disposition d'un modèle préclinique permettant de tester de nouvelles approches thérapeutiques dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'évolution clinique est un apport précieux. En effet, les observations conduites dans notre modèle représentent un atout majeur pour la conception d'un dossier de demande d'autorisation d'essai clinique auprès des autorités réglementaires. Notre projet est donc véritablement dédié au transfert rapide de données précliniques vers le lit du patient.

**8702** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité globale, avec plus de 17% des décès qui leur sont imputables (Organisation Mondiale de la Santé, 2012). En France, parmi les 150 000 morts d'origine cardiovasculaire chaque année, 27% sont associées à un infarctus du myocarde et 23% à l'insuffisance cardiaque (Société Française de Cardiologie, 2015).

Notre Recherche pharmacologique se concentre aujourd'hui sur la manière de protéger la fonction cardiaque lors d'une atteinte initiale, afin de prévenir ou de freiner l'évolution de sa dégradation au cours du temps. Elle vise également à prévenir ou traiter les différents facteurs de risque (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie), réduisant ainsi la probabilité de survenue de ces événements cardiovasculaires.



Le processus de sélection d'un candidat médicament nécessite une phase précoce d'exposition chez l'animal vigile afin de déterminer les paramètres de pharmacocinétique (i.e. étudier le devenir de la molécule dans l'organisme), d'efficacité (i.e. valider son effet sur le paramètre cardiovasculaire cible) et d'innocuité (i.e. vérifier l'absence d'effet potentiellement délétère sur la fonction cardiaque) d'une molécule. Les évaluations in vivo de pharmacocinétique, d'efficacité et d'innocuité d'une molécule sont des étapes clés dans le processus de sélection d'un candidat médicament. Elles renseignent du comportement de celui-ci dans un organisme entier (i.e. le mode d'administration, la dose efficace), de son mode d'action (i.e. de l'effet principal sur la fonction cardiaque) mais également de ses éventuels effets indésirables (électrocardiogramme, fréquence cardiaque et pression artérielle) qui ne peuvent être exclus à ce stade, malgré un recul important sur l'ensemble des études préliminaires (in vitro, ex vivo et in vivo). Le remplacement vers un modèle in vitro n'est à l'heure actuelle pas possible. Ce projet intervient cependant à la suite de nombreuses études et résultats préliminaires in vitro, ex vivo et parfois in vivo chez le rongeur mais également de données prédictives de pharmacocinétique.

Après validation de ces prérequis et passage de ces phases de présélection, les candidats médicaments, seront administrés aux porcs.

Ce projet constitue également une étape de sélection des molécules candidates en intervenant en amont des études d'efficacité chronique sur des modèles présentant des symptômes similaires à ceux observés chez le patient et couvertes par d'autres projets autorisés.

L'utilisation du porc dans la Recherche cardiovasculaire se justifie par une anatomie et des constantes physiologiques semblables à celles observées chez l'Homme (en fréquence cardiaque et en pression artérielle), mais également par une dimension corporelle propice à une instrumentation chirurgicale précise permettant une investigation fiable et reproductible de la fonction cardiaque.

Les 3R sont pris en compte dans la conception de ce projet à plusieurs niveaux :

La télémétrie, procédé permettant la mesure à distance d'un paramètre physiologique, représente la technique de référence dans la plupart de nos études. Si elle nécessite une étape préalable de chirurgie invasive (réalisée sous couverture anesthésique et analgésique pré et post-opératoire) pour l'implantation des capteurs spécifiques, elle permet de suivre l'évolution du paramètre d'intérêt à distance (i.e. sans externalisation des câbles et contention des animaux), à l'état éveillé, en l'absence de contrainte, en temps réel, dans son environnement et en présence d'autres congénères.

Les études se feront sur un mode d'administration dit de « wash-out » où chaque animal sera soumis à plusieurs séquences d'évaluation de candidats médicaments successives intercalées de phases de wash out (des temps nécessaires à l'élimination du candidat médicament par l'organisme et allant de quelques jours à une semaine). Ceci nous permet de réduire et raffiner le nombre d'animaux nécessaires sans compromettre les analyses statistiques. Dans ce contexte un même animal pourra être maintenu pendant plusieurs mois (jusqu'à 6 mois).

La télémétrie présente néanmoins quelques limites techniques et ne permet pas par exemple la transmission de certains paramètres cardiaques pouvant présenter un intérêt pour des projets spécifiques. Nous pourrions être amenés à évaluer exceptionnellement ces paramètres via une autre approche nécessitant l'implantation de cathéters externes. Les mesures seront toujours effectuées à l'état vigile, mais cette fois dans un contexte plus contraint intercalées de périodes de wash-out comme pour la télémétrie. Les porcs dans cette approche ne pourront pas être maintenus plus de quelques mois (2 à 3 mois) dans un environnement de laboratoire contrôlé mais éloigné de leurs congénères.

Pour assurer notre capacité d'évaluation de candidats médicaments, nous évaluons à 15 le nombre de porcs nécessaires par année en tenant compte d'un nombre minimum nécessaire de 3 par groupe et du mode d'administration par « wash-out » qui va permettre dans ce projet d'évaluer plusieurs candidats successivement sur un même animal et limiter ainsi le nombre d'animaux nécessaires. Ce projet va nécessiter ainsi 75 porcs sur une durée totale de 5 ans.

Pour satisfaire au bien-être des animaux, les boxes seront enrichies d'une litière végétale dans laquelle l'alimentation est dispersée afin de stimuler les instincts de fouissages. Des balles de jeux et des éléments à mastiquer seront également mis à disposition des animaux afin d'améliorer leur confort. Par ailleurs un suivi spécifique de leur état général et de leur comportement sera assuré afin de veiller à leur bon état de santé. Si dans le cadre de certains projets la télémétrie ne pourra représenter la

méthode d'investigation optimale, les mesures hémodynamiques vigiles seront conduites dans une salle isolée des nuisances extérieures et en dehors de ces phases de mesure les animaux devront être maintenus dans des boxes individuels.

**8703** De nombreuses études mettent en avant le rôle du sommeil sur la consolidation des informations en mémoire. Des études réalisées chez l'homme ont montré une diminution des performances mnésiques après privation de sommeil. Cela suggère un rôle favorable du sommeil sur la mémorisation. D'autres travaux réalisés chez l'homme et chez le rat montrent au contraire que la privation de sommeil hyperactive des structures impliquées dans la gestion des émotions et la mémoire émotionnelle rendant un sujet plus émotif. Cette mémoire émotionnelle est classiquement étudiée chez le rongeur via le conditionnement de peur au contexte qui consiste à associer un contexte initialement neutre à un stimulus aversif (choc électrique de faible intensité) afin que l'animal développe une peur envers ce contexte. Plusieurs indices comportementaux nous permettent d'identifier la peur chez le rongeur : l'immobilité comportementale et l'émission d'ultrasons. Nos récents résultats semblent en outre montrer que cette émission d'ultrasons peut être observée durant le sommeil paradoxal de rats ayant été conditionné à un contexte.

Notre étude a donc deux objectifs : 1) mettre en évidence le rôle de la communication entre l'hippocampe et l'amygdale, deux structures cérébrales impliquées respectivement dans la mémoire et les émotions, pendant le sommeil paradoxal, et durant le processus de consolidation d'un conditionnement de la peur au contexte, et 2) étudier l'émission des ultrasons et de leur rôle sur l'expression de ce conditionnement.

Les rats seront implantés avec des microélectrodes intracérébrales dans les structures citées au dessus sous anesthésie générale lors d'une opération en asepsie avec administration d'analgésique. Pour l'objectif 1, un virus de classe I sera injecté pour permettre l'inactivation de la communication entre l'hippocampe et l'amygdale, ceci par l'intermédiaire d'une stimulation lumineuse par fibre optique insérée dans le cerveau.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences des 3Rs :

#### 1) Remplacement

Le sommeil et la mémoire ne pouvant s'étudier que chez l'animal entier, nous avons choisi le rat comme modèle d'étude. En effet, les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant la mémorisation durant les états de vigilance.

#### 2) Réduction

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Nous prévoyons d'utiliser 72 rats. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour faire tous les contrôles requis aux expériences visant à répondre aux deux objectifs que nous venons de décrire. Ce nombre se justifie aussi par le fait que chaque rat ne pourra faire partie que d'un projet parmi les deux proposés (48+24 respectivement).

#### 3) Raffinement

Les études sur le sommeil et la mémoire nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Durant les enregistrements, l'animal est libre de ses mouvements. L'implantation des électrodes se fait sous anesthésie générale et analgésie sur 48h par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos au minimum sept jours, pendant lesquels leur bien-être est surveillé et évalué quotidiennement. Si les animaux présentent des signes de mal-être l'expérimentation est arrêtée temporairement pour les soins appropriés ou définitivement.

**8704** Ces travaux pratiques (TP) destinés à des étudiants en licence professionnelle, ont pour objectif de former des cadres polyvalents de niveau assistants d'ingénieurs aptes à une insertion professionnelle

immédiate dans des secteurs divers, privés ou publics, concernant les domaines du diagnostic, de la recherche, du développement et de l'analyse. Ces étudiants sont amenés ensuite à travailler dans le domaine du vivant. Les professionnels qui les recrutent apprécient d'avoir un personnel formé en expérimentation animale.

Les objectifs pédagogiques de ce TP sont doubles et répondent au programme pédagogique de la licence :

- former les étudiants à la mise en œuvre d'expérimentation animale : procédures faiblement invasives (injections intrapéritonéale et sous-cutanée) et prélèvements sanguins. Ce TP fait partie de la formation réglementaire à l'expérimentation animale (niveau praticien) que nous sommes autorisés à dispenser annuellement à 20 étudiants de cette licence.

- former les étudiants en bactériologie et en sérologie au travers de cette expérimentation qui est une infection sur souris par une souche bactérienne non pathogène pour l'homme : *Salmonella Abortusovis*.

*Salmonella Abortusovis* est une bactérie qui infecte les ovins, et éventuellement les caprins à l'échelon mondial. L'infection induit des avortements, voire la mortalité chez les jeunes causant des pertes économiques chez les éleveurs. La transmission (par voie orale, conjonctivale ou respiratoire) se fait par l'introduction d'animaux infectés dans les troupeaux.

L'isolement de la bactérie permet de faire le diagnostic car il n'y a que peu de symptômes chez l'animal infecté. L'immunisation par vaccination est un moyen de réduire les pertes et l'excrétion au moment de la mise-bas. Il a été montré qu'une immunité protectrice contre la salmonellose abortive ovine n'est pas obtenue par des vaccins constitués de bactéries inactivées. La mise au point d'un vaccin vivant a donc été l'option retenue pour éradiquer la maladie. Un vaccin, *Salmonella Abortusovis* Rev.6, a été développé en 1981 à partir d'une souche virulente de *Salmonella Abortusovis* (mutant à virulence atténuée de cette souche). La stabilité du vaccin, sa virulence résiduelle (persistance suffisamment longue pour induire une immunité durable) ont été démontrées chez la souris.

La souris est le modèle le plus adapté à la réalisation d'infection expérimentale avec cette bactérie car elle présente une certaine sensibilité à la bactérie en fonction de la lignée de souris. La bactérie peut, après l'autopsie, être retrouvée dans la rate et dans une moindre mesure dans le foie.

Les étudiants vont étudier grâce à une analyse statistique en mettant en commun l'ensemble de leurs résultats, l'effet de la voie d'inoculation (intra-péritonéale ou sous-cutanée dorsale) du vaccin Rev.6 dans deux lignées de souris, à 2 doses différentes par voie d'inoculation chez la souris Balb/C uniquement (une seule dose par voie chez la souris CD1 car cette lignée est résistante à l'infection) et sur la formule sanguine, la quantité de bactérie retrouvées dans la rate, le taux d'anticorps du sérum (prélèvements sanguins à J0 et J10 post-inoculation), la visualisation histologique des bactéries et les modifications histologiques de la structure du foie. En effet, par voie intrapéritonéale, la dose bactérienne injectée est inférieure à celle injectée par voie sous-cutanée. Les données recueillies seront analysées statistiquement. Les organes seront prélevés à J10.

Remplacement : à la sortie de la licence, les étudiants doivent être sensibilisés à la manipulation sur animaux vivants et savoir comment réaliser une expérimentation animale dans sa globalité. Il est donc nécessaire qu'ils pratiquent eux-mêmes ces manipulations.

Le programme pédagogique de la licence auquel nous devons nous conformer inclut un module intitulé « expérimentation animale ». Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement permettant la formation appropriée de nos étudiants. Ce TP fait partie de notre formation niveau praticien pour les procédures faiblement invasives et prélèvements sanguins chez la souris.

Réduction : travail en binôme sur une condition (une voie avec une dose dans une seule lignée de souris), soit 3 souris par étudiant pour réduire le nombre d'animaux. Un lot témoin (n=6) par souche de souris, commun à l'ensemble du groupe d'étudiants servira aux démonstrations des procédures par les enseignants et d'animaux surnuméraires en cas de besoin de remplacement de souris dans les lots en début de protocole.

Un lot (n=3) mis à mort à J3, servira de témoin positif d'infection hépatique à l'ensemble du groupe pour les analyses immunohistochimiques.

Mise en commun des résultats de l'ensemble du groupe afin de réaliser les comparaisons statistiques.

Nombre de souris revu à la baisse en fonction du nombre d'étudiants.

Réalisation des TP par deux groupes de 16 étudiants maximum, soit 75 souris par groupe d'étudiants et par an. 12 souris sont prévues l'année 1 pour un essai de prélèvement sublingual, soit un total de 762 souris sur 5 ans.

Pas d'utilisation d'animal surnuméraire pour produire le sérum contrôle positif nécessaire au dosage des anticorps. Ce sont les sérums expérimentaux positifs de l'année n qui sont triés, poolés et servent pour l'année n+1.

Raffinement :

Avant le début de l'expérimentation, les étudiants sont sensibilisés à la préhension/contention des souris, aux procédures à réaliser (TD, vidéo) et au comportement à avoir (être calme, éviter les gestes brusques...), afin de limiter le stress des animaux.

Les souris sont acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine avant l'expérimentation et hébergées en groupe de 3 animaux socialement harmonieux par cage adaptée à l'espèce, avec un environnement enrichi (feuilles de sopalin et cabanes en polycarbonate ou carton).

Tout animal stressé ou malade est exclu et remplacé par un des animaux témoins.

Les souris sont anesthésiées pour le prélèvement sanguin et suivies par les étudiants avec l'équipe pédagogique tout au long de l'expérimentation.

**8705** Le but de ce projet est de créer une banque de tumeurs dans le cadre d'une maladie génétique rare du métabolisme du glucose, la glycogénose de type I. Les patients atteints par cette maladie sont incapables de produire du glucose (sucre) pour maintenir leur glycémie (taux de sucre dans le sang) entre deux repas. Ils souffrent donc d'hypoglycémies sévères, rapidement après un repas. A l'âge adulte, la plupart des patients développent des complications avec l'apparition d'adénomes hépatiques (tumeurs bénignes du foie) pouvant se transformer en carcinomes (tumeurs malignes). A l'exception d'un suivi nutritionnel très strict permettant aux patients de maintenir leur glycémie grâce à des repas fréquents même la nuit, il n'existe actuellement aucun traitement curatif et la transplantation hépatique est la seule solution lorsque le développement tumoral est trop important. Grâce à l'obtention d'un modèle de souris viables présentant toutes les caractéristiques de la pathologie hépatique, y compris le développement d'adénomes et carcinomes hépatiques à long terme, il est possible de mieux caractériser le développement de ces tumeurs hépatiques tout au long de la vie de la souris (2 ans). De façon intéressante, le développement de ces tumeurs et leur transformation en carcinomes sont fortement accélérés par une nutrition riche en graisses et en sucres.

Grâce à ce modèle de souris, nous proposons de créer une banque de tumeurs qui nous permettront de réaliser ensuite une étude moléculaire.

Les souris seront nourries soit en régime standard pendant 18 mois, soit en régime riche en sucre et en graisses pendant 9 mois. Les souris seront suivies quotidiennement, avec un suivi de leur poids régulier et de leur comportement et état général. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever le foie pour analyser le métabolisme hépatique, ainsi que les tumeurs afin de caractériser ces dernières et de créer une banque de tumeurs.

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

Remplacement :

Cette étude est difficile à réaliser chez l'homme car le nombre de patients est très limité et la pathologie est progressive et évolue sur plusieurs années. Aucune approche en culture cellulaire ne permet de développer les tumeurs et les caractéristiques de la pathologie hépatique. Notre étude nécessite donc de travailler sur l'organisme en entier pour conserver le développement de ces tumeurs. Elle sera donc réalisée chez la souris grâce à une approche de transgénèse qui permet de cibler des modifications du métabolisme uniquement dans le foie. Un prélèvement de cet organe sera réalisé pour nous permettre de faire l'étude moléculaire.

-Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur le modèle animal développant des tumeurs hépatiques. Le groupe de souris « contrôles » nous permet de comparer le métabolisme hépatique et les voies moléculaires impliquées dans le

développement tumoral. Ces souris ne devraient pas développer de tumeurs et un groupe de 15 souris/conditions nutritionnelles est suffisant pour l'analyse moléculaire car le foie est homogène.

Quant au nombre d'animaux transgéniques, il a été fixé à 30 animaux par conditions nutritionnelles pour obtenir un nombre suffisant de tumeurs et effectuer des analyses statistiques. Au total, ce projet nécessitera au maximum 90 souris sur une période de 5 ans.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront manipulés et pesés régulièrement avec une observation quotidienne de leur état général. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Le développement de ces tumeurs n'entraînent pas de modification de comportement des souris, aucun signe de stress, ni de douleur. L'apparition de tumeurs de taille supérieure à 7-10 mm peut être mise en évidence par palpation de l'abdomen. Une dégradation de l'état général de l'animal et/ou une perte de poids pendant plusieurs jours consécutifs entrainera la fin de la procédure. L'utilisation d'analgésiques locaux permettra de limiter la douleur lors des prélèvements sanguins.

En conclusion, ce projet permettra de constituer une banque de tumeurs GSDI, qui seront caractérisées histologiquement et au niveau moléculaire pour les mécanismes impliqués dans le développement tumoral.

**8706** Le vieillissement est un phénomène physiologique responsable de nombreuses pathologies allant de la carcinogénèse en passant par les troubles métaboliques comme le diabète et les maladies neurodégénératives. Il a été montré que l'obésité, phénomène croissant dans la population mondiale, induit une sénescence (ou vieillissement) prématurée et participe à l'aggravation de pathologies comme le cancer du foie et le diabète. Un des enjeux actuels est de connaître les mécanismes impliqués dans cette sénescence prématurée, afin ensuite de proposer des stratégies thérapeutiques. Il a été mis en évidence qu'une voie métabolique, la voie mévalonate, peut être impliquée dans le vieillissement *in vitro*. Ce protocole vise à démontrer l'implication réelle de cette voie dans le vieillissement précoce induit par l'obésité dans un modèle *vivo*, en utilisant des inhibiteurs spécifiques de cette voie déjà utilisées en clinique. Par la suite de nouvelles approches thérapeutiques pourront être proposées.

Les retombées dans le domaine de la recherche sont importantes. L'identification de cette voie comme étant promotrice du vieillissement dans le cadre d'un stress métabolique pourra être élargie à d'autres modèles de vieillissement, qu'ils soient précoces ou physiologiques. Cela ouvrira ensuite des perspectives dans les nombreuses maladies liées à l'âge (Cancer, diabète, maladies neurodégénératives,...).

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

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Pour cela nous utiliserons 256 souris réparties de manière égale entre mâles et femelles.

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

**8707** Les dispositifs médicaux doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et défini dans les normes ISO 10993-6 et ISO 10993-11 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de dispositifs médicaux (DM) et en particulier les risques concernant les effets locaux après implantation selon l'ISO 10993-6 et la toxicité systémique avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique selon la durée d'exposition) selon l'ISO 10993-11.

Ces deux risques peuvent être évalués séparément et font l'objet de 2 normes distinctes. Cependant, dans un but éthique et afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, on s'attachera à coupler

ces études, dès que cela est possible, afin d'utiliser les mêmes animaux pour évaluer à la fois les effets locaux et les effets systémiques.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 65 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (tunnels en carton pour les rats ou briques en bois et plateforme pour les lapins).

Ce projet est constitué des études suivantes :

- Evaluation des effets locaux après implantation sous-cutanée : Cette étude est réalisée chez le rat ou le lapin (en général, un total de 5 rats ou 3 lapins est suffisant pour pouvoir analyser en histologie 10 sites d'implantation par dispositif ou par matériaux. Si l'étude est couplée avec l'évaluation de la toxicité systémique il faut alors ajouter un groupe contrôle séparé, soit un total minimum de 10 rats ou 6 lapins).

Ce test consiste à implanter chez l'animal, en sous-cutané, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. La durée de la période d'observation qui suit dépend de l'indication clinique du dispositif, de sa durée d'exposition chez le patient et de son éventuel temps de dégradation (peut aller de 2 semaines à 1 an). Pendant toute la période d'observation, les animaux seront régulièrement pesés, les sites d'implantation observés pour l'éventuelle apparition de réactions d'intolérance (par exemple présence d'érythèmes ou d'œdèmes). Des observations cliniques sur l'état général des animaux seront également conduites. A la fin de la période d'implantation, les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Selon le dispositif à évaluer, il peut être également nécessaire de prélever et d'effectuer les analyses histologiques des ganglions axillaires.

Remarque : pour s'adapter à la destination finale du dispositif, il est possible qu'un autre site d'implantation soit nécessaire. Par exemple, une administration dans l'espace synovial de l'articulation du genou chez le lapin. Dans ce cas, seul le site de traitement diffère, le reste des conditions à respecter est identique.

- Evaluation de la toxicité systémique après implantation avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique) : Cette étude est réalisée chez le rat ou le lapin (le nombre d'animaux dépend de la durée d'exposition à évaluer et de la nécessité ou non d'étudier les 2 sexes. Le minimum requis est de 10 rats ou 6 lapins pour une étude de toxicité subaiguë sur un seul sexe et le maximum est de 60 rats ou 32 lapins pour une étude de toxicité chronique sur les 2 sexes).

Ce test consiste à implanter chez le rat ou le lapin, en sous-cutané, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. Le principe est le même que pour l'évaluation des effets locaux décrite précédemment mais l'évaluation de la toxicité systémique est ajoutée. Il peut donc être également nécessaire pour certaines études de mesurer la consommation alimentaire et hydrique des animaux au cours de toute la phase expérimentale. Une analyse des urines peut également être nécessaire en fin de phase expérimentale. A la fin de la période d'implantation, un prélèvement final de sang est effectué afin de procéder aux analyses biochimiques, hématologiques et enzymologiques. Les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Une autopsie complète de l'animal est également réalisée et les principaux organes sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques.

Les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles :

- Signes observés seuls amenant à une euthanasie de l'animal : convulsions (continues pendant 15 minutes chez le rat et sans durée minimale chez le lapin), vocalisations continues pendant plus d'une minute en l'absence de contention, perte de poids  $\geq 20\%$  sur 72 heures, hémorragie importante, existence d'une plaie ouverte au niveau du site d'implantation qui ne se refermerait pas malgré les soins apportés.

- Signes en association pouvant amener à une décision d'euthanasier l'animal : cyanose, gasping, piloérection + prostration, animal conscient (réagissant à la stimulation) mais incapable de bouger, animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, pertes d'équilibre persistantes, détresse respiratoire sévère ou persistante. Le Directeur d'études devra déterminer au cas par cas sur l'association de ces signes, leur intensité et leur persistance dans le temps s'il peut conclure à une mort certaine de

l'animal et demander son euthanasie en considérant cette mortalité comme étant attribuable à l'élément d'essai administré.

Par ailleurs, ces études peuvent s'étaler sur une longue période (jusqu'à 1 an). De ce fait, certains animaux peuvent développer spontanément des pathologies non liées à l'implantation de l'élément d'essai (par exemple, apparition de tumeurs en particulier chez le rat). Dans ce cas, les possibilités de soins à apporter aux animaux sont assez réduites. Ces animaux devront être suivis régulièrement afin de limiter au maximum leurs souffrances et décider ou non de leur euthanasie.

**8708** Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active pré existante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie.

Les ultrasons thérapeutiques sont aujourd'hui utilisés en clinique pour le traitement du cancer de la prostate et sont à l'étude comme traitement prometteur de nombreuses autres tumeurs solides (sein, foie, pancréas, ...). Ces traitements par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) reposent sur une focalisation du faisceau acoustique pour induire localement une destruction thermique ou mécanique de la tumeur. Ce traitement a l'avantage d'être non invasif et bien toléré. Cependant, quelques limites existent encore. Une lyse tumorale incomplète (tumeurs de grande taille) peut mener à une récurrence locale post-traitement. Deuxièmement, ces traitements ne peuvent pas être utilisés pour traiter de manière systémique, et particulièrement les métastases à distance, première cause de mortalité après un traitement HIFU.

Des travaux récents ont montré que les HIFU pourraient avoir une action locale et systémique sur la réponse immunitaire anti-tumorale et que cette réponse était dépendante de l'effet induit (thermique et mécanique) et des paramètres appliqués.

L'objectif de nos études est de caractériser le potentiel des ultrasons focalisés à stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale et à en comprendre les mécanismes. Cela passe par l'étude de l'effet des paramètres ultrasonores appliqués ainsi que l'effet du modèle induit. L'étude sera donc coordonnée comme cela : étude de deux paramètres ultrasonores sur un modèle mammaire afin d'analyser l'impact des paramètres ultrasonores sur la réponse immunitaire anti-tumorale et de sélectionner le paramètre ultrasonore le plus performant puis étude de ce paramètre sur trois autres modèles tumoraux (mammaire, adénocarcinome du colon et mélanome). Le traitement mécanique est privilégié de par son efficacité plus importante d'après la littérature et son innocuité (les effets secondaires d'un tel traitement sont faibles et réversibles : pétéchies, hématomes, lésions cutanées superficielles).

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : l'étude de la réponse immunitaire est rendu impossible in vitro de par la complexité des interactions des cellules de l'immunité avec l'environnement tumoral. L'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale face à un traitement ne peut donc pas être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Le nombre d'animaux sera réduit a minima, avec un nombre total de 230 souris pour 27 lots pour l'ensemble de l'étude. Une définition précise des points limites est donnée ci-après, prend compte des limites de chaque modèle et seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, enrichissement du milieu) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement testés par simulations numériques et tirs sur tissus ex vivo se rapprochant le plus possible des caractéristiques des tumeurs étudiées.

**8709** Chez l'homme, les toxines botuliques (BoNTs), majoritairement de type A (BoNT/A) sont utilisées principalement par voie intra-musculaire (i.m.) pour traiter des maladies neuromusculaires. Les données de la littérature scientifique montrent que ces toxines peuvent diffuser hors du muscle

injecté, et atteindre des tissus à distance. Selon la quantité de toxines qui diffuse il y a un risque de toxicité pouvant conduire à un botulisme caractérisé par de nombreux effets indésirables graves. Ce phénomène serait lié à une diffusion des BoNTs par voie nerveuse vers la moelle épinière et/ou générale par voie sanguine. Cependant il n'existe actuellement pas de preuves réelles confirmant la présence de BoNTs actives dans le sang ou la moelle épinière après une injection intra-musculaire, la quantité extrêmement faible de toxines injectées (picogrammes) rendant sa détection très difficile. Les méthodes analytiques permettant de détecter directement la toxine ou son activité dans les tissus sont très limitées et ne sont pas assez sensibles. Toutefois, l'étude des mécanismes de diffusion des BoNTs est essentielle afin de mieux comprendre et prédire leur toxicité, et ainsi améliorer la sécurité chez le patient des traitements actuels et en cours de développement.

L'objectif de cette étude est donc de détecter dans le sang et la moelle épinière l'activité biologique de BoNTs injectées en intra-musculaire dans le mollet (muscle gastrocnémien chez le rat). Nous avons développé dans notre laboratoire une méthode d'immunohistochimie très sensible, robuste et spécifique permettant de quantifier l'activité biologique directe de BoNT/A, uniquement dans les muscles. Un premier lot de rats sera injecté avec la BoNT/A à différentes doses, puis le plasma et la moelle seront récupérés à différents temps après administration. Des extraits de ces derniers seront injectés en i.m. dans le gastrocnémien de rats naïfs. Les tissus seront prélevés 6 jours après administration pour évaluer l'activité biologique de BoNT/A avec notre méthode d'immunohistochimie. En parallèle, la présence de BoNT/A dans le plasma et la moelle sera aussi évaluée par des méthodes in vitro (culture de neurones) afin d'évaluer la sensibilité de ces tests qui n'est pas connue ou faible et confirmer les résultats si leur sensibilité est suffisante. De plus, si c'est le cas, il sera ainsi possible d'étudier la diffusion sanguine des BoNTs avec ces tests in vitro et non plus chez l'animal (Remplacement).

Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane, limitant ainsi la douleur et l'angoisse des animaux hébergés en groupe en milieu enrichi. Les doses efficaces et toxiques de BoNT/A sont bien connues et maîtrisées, ainsi que les signes cliniques précurseurs d'une intoxication aux BoNTs, ce qui permet d'établir une liste de points limites stricts (Raffinement).

Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet est estimé à 442, avec un nombre de rats traités réduit à 3 par groupe, strict minimum pour pouvoir atteindre les objectifs (Réduction). Ceci est réalisable grâce à la sensibilité et robustesse importantes de notre méthode d'immunohistochimie.

**8710** L'incidence de l'obésité et des pathologies associées (diabète, complications vasculaires, pulmonaires, digestives, etc) a atteint des proportions d'épidémie mondiale et il est prévu que le nombre de personnes obèses doublera dans certains pays dans la décennie à venir. Les recherches ont montré que l'obésité provoque l'apparition d'une inflammation dans le tissu adipeux. Cette inflammation, causée par une dérégulation du système immunitaire, contribue au développement des pathologies associées à l'obésité comme le diabète. Bloquer l'apparition de l'inflammation, donc « maîtriser » le système immunitaire, semble être une stratégie de traitement possible contre le développement du diabète. Cependant, le système immunitaire a de nombreuses fonctions physiologiques telles que combattre les infections et guérir les blessures, et son efficacité pourrait être diminuée par ce type de traitement. Le but de ce projet est donc de déterminer si malgré un déficit du système immunitaire (bénéfique dans le cadre d'une obésité) les souris sont capables de vaincre une infection. Notre molécule d'intérêt (PPARbeta) est exprimée dans les cellules T qui sont des cellules immunitaires. PPARbeta est connu pour favoriser les réponses de type anti-inflammatoires. Potentiellement bénéfique dans un contexte d'obésité, nous nous intéresserons ici à son rôle suite à une infection bactérienne mimée expérimentalement par une injection de LPS qui est un composant de la paroi bactérienne. Les souris utilisées pour nos expériences sont génétiquement modifiées afin d'exprimer spécifiquement dans les cellules T des niveaux de PPARbeta supérieurs ou inférieurs au niveau de base dans ces cellules. Ces différentes lignées de souris ne présentent aucun phénotype dommageable. Nous réaliserons 3 procédures différentes : une étude de survie, une étude cinétique de la réponse inflammatoire précoce et une étude de la réponse secondaire des cellules immunitaires in vitro (après une injection de LPS in vivo). A l'exception de l'étude de survie pour laquelle les souris pourront présenter certains dommages (comme l'absence de toilettage,



prostration ou agitation, perte de poids), peu de dommages sont attendus pour les autres procédures car elles sont de courte durée.

Les 3R :

-Réduction : 1) Nous effectuerons une étude préliminaire (utilisation d'un nombre d'animaux restreint à 5 souris par groupe) qui nous permettra de définir les conditions expérimentales optimales de notre expérimentation. 2) L'utilisation d'une seule lignée de souris comme groupe contrôle nous permettra de réduire le nombre d'animaux générés.

-Remplacement : Nous ne pouvons pas effectuer de remplacement pour ce projet puisque le système immunitaire est un système intégré et complexe qui ne peut être reproduit en culture.

-Raffinement : Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les souris seront suivies quotidiennement (hors week-end) par les animaliers et plusieurs fois par jour par les expérimentateurs afin de détecter au plus tôt tout signe de souffrance et d'y remédier. Ce projet, basé sur l'utilisation d'expériences de courtes durées associées à un suivi accru des animaux en particulier pour l'étude de survie, nous permet de réduire/limiter les dommages attendus pour nos souris.

Nous estimons que le nombre minimum de souris nécessaire pour mener à bien ce projet et obtenir des résultats statistiquement significatifs, en tenant compte de la règle des 3R, est de 420.

**8711** Le cancer étant la deuxième cause de mortalité mondiale, il est nécessaire de trouver de nouveaux traitements. Il a récemment été mis en évidence qu'un récepteur spécifique des cellules cancéreuses induit leur mort cellulaire, tout en épargnant les cellules saines. C'est donc une cible de choix pour des anticorps thérapeutiques, qui présentent une grande spécificité et efficacité. Actuellement, aucune solution thérapeutique ciblant ce récepteur n'est disponible pour les patients. Les tests in vitro avec les anticorps reconnaissant le récepteur sont très concluants. Il est donc nécessaire de les tester au sein d'un organisme entier, ce qui n'est pas encore possible in vitro.

L'objectif de cette étude est donc de tester l'efficacité d'un traitement anticancéreux ciblé, dans un organisme vivant, entier et complexe, avant de passer chez l'Homme. Si l'efficacité de l'anticorps est ainsi démontré, il pourra être testé chez l'Homme et ainsi permettre de soigner encore plus de personnes atteintes de cancer.

Pour cette étude, 300 souris vont être utilisées : 30 souris pour un premier test de pousse tumorale et d'effet dose de l'anticorps, puis 30 souris par lignée cancéreuse : 10 recevant 10 mg/kg d'anticorps, 10 recevant 2,5mg/kg d'anticorps et 10 recevant que du tampon (groupe témoin). 3 lignées cancéreuses seront utilisées et les expérimentations seront répétées 3 fois. Ce nombre a été optimisé afin d'obtenir un résultat scientifique acceptable, tout en limitant au maximum le nombre d'animaux. Ces souris vont avoir plusieurs traitements, globalement faiblement douloureux. Le premier sera l'injection de cellules tumorales en sous-cutanée. Cette méthode sera effectuée sous anesthésie. Les souris recevront ensuite le traitement par injection intra-péritonéale (i.p.), encore sous anesthésie. La pousse tumorale sera ensuite monitorée par mesure des tumeurs ainsi que par évaluation de l'état général/global de la souris, en apportant les soins nécessaires : suivi des animaux au moins 3 fois par semaines, et ajout d'une crème cicatrisante en cas de nécrose. Pour éviter le stress des souris, elles seront acclimatées et habituées aux manipulateurs. Leur environnement sera enrichi en jeux et grignotages. Lorsque les tumeurs seront jugées trop importantes (1500 mm<sup>3</sup>), les souris seront anesthésiées sans réveil. Les souris recevant le traitement seront alors comparées aux souris témoins. Si l'efficacité de l'anticorps est démontrée, ce traitement pourrait offrir une nouvelle solution thérapeutique pour les patients atteints de cancer.

**8712** Le but de ce projet est de déterminer l'effet d'un produit sur la diarrhée chez le rongeur libre de ses mouvements.

La diarrhée est un trouble fréquent qui peut être provoqué par de nombreux facteurs comme l'alimentation, des médicaments, des microorganismes, du stress ou durant certaines pathologies. Elle se caractérise par des selles de consistance liquide ou molle, plus volumineuses et nombreuses qu'à l'habitude. Il en résulte une perte plus ou moins importante de liquide et de sels minéraux par l'organisme.

La diarrhée est la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de cinq ans (OMS). Elle tue 760 000 enfants chaque année, peut durer plusieurs jours, déshydratant l'organisme et le privant des sels minéraux nécessaires pour la survie.

L'apparition d'une diarrhée implique des processus physiologiques variés qui dépendent de la cause, et qui concernent de nombreux paramètres dont le système nerveux autonome et le microbiote. Un modèle *in vitro* ou l'utilisation de cultures de cellules ne sont pas pertinents pour étudier ces processus. Le protocole sur l'animal vivant est indispensable pour évaluer les effets de produits modulant ces systèmes physiologiques complexes.

Le nombre d'animaux (rat et souris) utilisé est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire de 12 animaux maximum par dose étudiée. Le nombre de doses étudiées est de 3 à 6 au plus par produit, et elles sont déterminées en fonction de résultats précédents ou de données de la littérature, pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, soit 72 animaux par produit. Au maximum, 5 produits seront étudiés par an, soit 360 animaux au plus par an, dans 4 procédures différentes, soit 7200 animaux au plus pour la durée maximale du projet. Les animaux utilisés seront des souris (3600 au maximum) ou des rats (3600 au maximum).

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté, un suivi quotidien de leur bien-être et l'application des points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Le but de ce projet est de déterminer l'intérêt d'un produit pour réduire et/ou prévenir une diarrhée.

**8713** Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules sanguines du système immunitaire qui exercent une activité cytotoxique anti-tumorale et anti-virale. Elles peuvent aussi être associées à des réponses délétères comme des allergies ou des maladies autoimmunes telles que la maladie de Crohn, la Sclérose en plaques ou encore divers formes sévères de dermatites. Des composés empêchant ces cellules NK d'accomplir leurs actions pathologiques pourraient être bénéfiques dans ce genre de maladie.

Récemment, nous avons identifié des composés, qui sembleraient diminuer l'activité cytotoxique des cellules NK, les empêchant donc d'agir.

La réglementation ne permet pas de tester directement une molécule chez l'Homme sans avoir recours au préalable à l'animal. C'est pourquoi, nous avons besoin de tester l'efficacité des ces composés chez la souris.

Nous avons précédemment montré l'efficacité de ces molécules dans des modèles *in vitro*. Cependant, il reste à confirmer ces résultats *in vivo* car les modèles d'action cytotoxique que nous utilisons *in vitro* ne reflètent pas vraiment la situation *in vivo*.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux. Le nombre d'animaux est donc estimé à 400 souris sur 3 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées. La souffrance et l'angoisse de l'animal seront diminuées au maximum. Des analyses *in vitro* seront réalisées en parallèle afin de compléter les résultats obtenus.

**8714** *In vitro*, il a été montré que BRCC3 contrôle 2 voies clés de la réponse innée : la voie de l'IFN et celle de l'inflammasome NLRP3. Ces deux voies sont impliquées dans des autoinflammations héréditaires (cryopyrin-associated syndrome, interféronopathies) et surtout dans de nombreuses pathologies très répandues telles que l'athérosclérose, diabète de type 2, Alzheimer, et autres maladies neurodégénératives, silicose, amiante, arthrite goutteuse.

L'objectif scientifique du projet est de générer une lignée de souris BRCC3 *-/-* sur fond génétique C57B6J (par technologie CRISPR/Cas9) pour tester si l'inactivation de BRCC3 conduit à un phénotype dommageable. Nous utiliserons au maximum 720 souris (240 wild type, 240 hétérozygotes BRCC3 *+/-* et 240 homozygotes BRCC3 *-/-*) sur une cohorte de la naissance jusqu'à l'âge de 24 mois. In fine, l'établissement de la lignée BRCC3 *-/-* permettra d'évaluer l'impact de BRCC3 dans la réponse immunitaire *in vivo* pour lutter contre les pathologies sus-citées.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point avec des points limites suffisamment prédictifs pour respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et ainsi permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, les études in vitro ne nous permettant pas de reproduire les mécanismes de l'inflammation que nous étudions dans ce projet.

**8715** Les pathologies obstructives des artères coronaires sont une cause majeure de dysfonction cardiaque, menant à des remodelages structurels qui aboutissent à un arrêt cardiaque. Les maladies cardiaques sont dans les nations industrialisées, une étiologie prédominante d'invalidité et de mortalité aussi bien chez l'homme que chez la femme.

L'occlusion d'une artère coronaire majeure résulte en l'ischémie et la mort cellulaire potentielle dans la zone anatomique du cœur irriguée par cette artère, appelée région à risque. Le remodelage ventriculaire est le processus qui survient suite à un IM aigu. Il englobe, d'une part, la perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose aboutissant à l'espacement des cellules contractiles, et d'autre part, l'amincissement de la paroi du ventricule gauche (VG), mais aussi la dilatation du VG ainsi que l'accumulation de collagène. Ces altérations architecturales complexes surviennent non seulement dans la zone infarctée mais également dans le tissu cardiaque sain après un IM. En effet, des effets compensatoires par hypertrophie, dilatation et hypercinésie des territoires non ischémiques apparaissent. Bien que ce remodelage cardiaque soit initialement une réponse adaptative, il conduit progressivement à une dilatation menant à une insuffisance cardiaque par congestion.

La restauration cardiaque suite à un IM nécessiterait le remplacement des myocytes endommagés et la restauration du flux sanguin, et ce, afin de limiter le remodelage du ventricule gauche et de sauver les cardiomyocytes hibernants. La thérapie cellulaire par l'injection des cellules souches embryonnaires pluripotentes présente un potentiel intéressant pour la réparation tissulaire cardiaque et consiste un espoir thérapeutique considérable.

La souris est l'espèce la plus étudiée en recherche biomédicale et son utilisation remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Le génome murin étant très proche de l'humain, la majorité des gènes humains ont leur homologue chez la souris. De plus, le génome murin a été largement séquencé et, de ce fait, la localisation des gènes est connue. En ce qui concerne les études sur la fonction cardiaque, le modèle d'IM par ligature de l'artère coronaire est largement utilisé et a permis de démontrer que l'altération de la structure et de la fonction cardiaque après ligature de l'artère coronaire chez la souris est proche des changements physiopathologiques dans le cœur humain ischémié. Ainsi, ce modèle ne peut être REMPLACÉ par un modèle in vitro.

Par conséquent, nous établissons un modèle minimalement invasive et simple d'infarctus du myocarde chez les souris par ligation de l'artère coronaire descendant gauche. Afin de minimiser toute douleur post opératoire (RAFFINEMENT), les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché et des analgésiques seront utilisés.

Nous tacherons de REDUIRE au maximum le nombre d'animaux utilisés, 92 souris réparties sur différents groupes seront utilisées afin de mettre au point le modèle et de réaliser la thérapie cellulaires pour voir la capacité des cellules à réparer les tissus lésés in vivo. Ainsi, ce modèle répond aux exigences du principe des 3R (remplacement, raffinement et réduction) pour les expérimentations animales et assure l'information scientifique nécessaire au développement de stratégies thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

**8716** Notre équipe a récemment montré la faisabilité de réduire la croissance de xénogreffes de cancer de colon en utilisant un anticorps couplé à un isotope radioactif se fixant sur la tétraspanine 8 humaine TSPAN8, une protéine de la membrane cellulaire exprimée dans le cancer du côlon. L'effet de la radioimmunothérapie sur les tissus sains exprimant Tspan8 dans les épithéliums intestinaux ne peut être abordée dans ces modèles car les anticorps anti-TSPAN8 humaine ne reconnaissent pas l'antigène murin. Notre projet utilisera donc deux anticorps monoclonaux différents reconnaissant la protéine murine dans le modèle d'adénomes coliques Apcmin/+. Les souris APCmin/+ sont porteuses d'une modification génétique induisant chez la souris des adénomes coliques, constituant le modèle

d'une maladie humaine (polyadénomatoïse familiale). Le projet se déroule en trois temps : 1) les souris ayant développé les polypes tumoraux recevront les anticorps radiomarqués pour connaître leur fixation relative entre les épithéliums sains et les tumeurs (n=72). 2) si un différentiel significatif de fixation est mis en évidence, les souris seront traitées par des doses thérapeutiques d'anticorps radiomarqués (radioimmunothérapie - RIT) (n=98) 3) des études mécanistiques permettront d'appréhender les mécanismes mis en jeu dans les réponses observées (n=84). Chacune de ces étapes comportera des animaux Apcmin/+ qui ont été invalidés pour le gène Tspan8 et serviront d'animaux contrôles (96 sur les 3 études, animaux comptabilisés précédemment dans chacune des études). Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3Rs, utilisant des conditions de stabulation, de bien être animal et un nombre de souris optimisé. L'ensemble du projet comprendra 254 souris sur 3 ans.

Dans le cadre de ce projet, les différents protocoles s'inscrivent dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le nombre d'animaux est réduit au maximum et le bien-être animal est assuré par une surveillance quotidienne et des conditions d'hébergement optimisées. En effet les animaux seront hébergés dans des cages de 435cm<sup>2</sup> contenant de l'enrichissement de milieu (cabane, coton, bois à ronger) afin de favoriser le comportement naturel des animaux et limiter ainsi leur angoisse. Les cages seront placées dans des portoirs ventilés individuellement avec un cycle de lumière 12h/12h dans une pièce d'hébergement thermostatée à 24°C dans le but de respecter les normes d'ambiances de l'espèce. Pour limiter le risque infectieux le changement des cages et des litières sera réalisé de façon hebdomadaire.

Afin d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance lors des expérimentations, les animaux seront anesthésiés à l'isoflurane (cage d'anesthésie puis masque adapté à l'espèce). Suite à ces expérimentations les animaux seront en plus du contrôle quotidien, observés de façon plus poussée trois fois par semaine avec notamment le suivi de la croissance tumorale (sur animal anesthésié à l'isoflurane) et du poids. Si un animal présente une perte de poids anormale, ou un comportement suspect indiquant un mal-être ou une douleur ou atteint le point limite (annexe) il sera euthanasié (dislocation cervicale sous anesthésie) dans les plus brefs délais

**8717** L'annexine A1 (ANXA1), protéine connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, est associée à l'agressivité de différents cancers dont le mélanome et le cancer du sein triple négatif (CSTN). Des études cliniques ont montré que la survie sans métastases de patients atteints de mélanome est inversement proportionnelle au niveau d'expression de l'ANXA1 dans les mélanomes primitifs. D'autre part, une corrélation entre cette protéine et l'agressivité du cancer du sein a également été mise en évidence, les tumeurs exprimant l'ANXA1 sont associées à un phénotype triple négatif. ANXA1 est en effet impliquée dans de nombreux processus incluant la prolifération, la migration/invasion des cellules tumorales mais également la réponse du système immunitaire dans la progression tumorale et/ou dans la réponse/résistance aux traitements. Cette protéine peut activer la migration et l'invasion des cellules tumorales mais également modifier l'immunité en contrôlant certaines cellules du système immunitaire. ANXA1 peut être considérée comme une cible émergente d'intérêt dans le mélanome et le CSTN. Dans cette étude nous nous proposons d'évaluer son potentiel thérapeutique dans des modèles précliniques de mélanome et de CSTN. ANXA1 ayant un rôle dans l'immunité, il est nécessaire de réaliser une partie nos études dans des modèles syngéniques immunocompétents. Cependant, il est aussi requis de réaliser des études sur des lignées humaines implantées sur des animaux immunodéprimés.

Une première étude (Etude A : Mise au point des modèles précliniques) sera réalisée sur des modèles de CSTN et de mélanome. Cette première étude permettra de caractériser les modèles in vivo en fonction de leur croissance et de leur capacité invasive. Cette mise au point servira également à raffiner les études suivantes (B à D) en sélectionnant une seule lignée humaine de CSTN. Cette expérience préliminaire nous permettra également de réaliser des études ex vivo sur les tumeurs. Dans cette étude 120 souris seront utilisées.

La seconde étude (Etude B : Immunothérapie) visera à étudier le blocage de l'activité d'ANXA1 extracellulaire par immunothérapie via un anticorps reconnaissant les protéines ANXA1 natives humaines (modèles xénotransgéniques) et murines (modèles syngéniques). L'effet de ce blocage sera

évalué sur le développement tumoral et sur la formation de métastases. Cette étude comportera 288 souris.

En fonction des résultats de l'étude B, une troisième étude sera réalisée (Etude C : Biodistribution) afin d'évaluer la biodistribution de l'Ac anti ANXA1 dans les différents modèles sélectionnés dans l'étude A. Cet anticorps sera radiomarqué par l'indium-111 afin de suivre en imagerie gamma et par prélèvement à différents temps, le profil d'expression d'ANXA1 dans les souris. Le challenge sera d'imager ANXA1 extracellulaire dans la/les tumeur(s). Dans cette étude 336 souris seront utilisées.

Les études B et C détermineront ainsi la faisabilité ou non de la dernière étude (Etude D : Radio immunothérapie -RIT) qui visera à étudier l'effet d'un Ac dirigé contre l'ANXA1 radiomarqué par le lutétium-177 sur la croissance tumorale et la survie d'un modèle préclinique de mélanome et de CSTN (sélection en fonction des résultats des études A à C). Cette étude nécessitera 112 souris.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3Rs, utilisant des conditions de stabulation, de bien-être animal et un nombre optimisé de souris. L'ensemble du projet comprendra 856 animaux sur 5 ans. Le nombre d'animaux est réduit au maximum et le bien-être animal est assuré par une surveillance quotidienne et des conditions d'hébergement optimisées. En effet les animaux seront hébergés dans des cages de 435cm<sup>2</sup> contenant de l'enrichissement de milieu (cabane, coton, bois à ronger) afin de favoriser le comportement naturel des animaux et limiter ainsi leur angoisse. Les cages seront placées dans des portoirs ventilés individuellement avec un cycle de lumière 12h/12h dans une pièce d'hébergement thermostatée à 24°C dans le but de respecter les normes d'ambiances de l'espèce. Pour limiter le risque infectieux le changement des cages et des litières sera réalisé de façon hebdomadaire.

Afin d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance lors des expérimentations, les animaux seront anesthésiés à l'isoflurane (cage d'anesthésie puis masque adapté à l'espèce). Suite à ces expérimentations les animaux seront en plus du contrôle quotidien, observés de façon plus poussée trois fois par semaine avec notamment le suivi de la croissance tumorale (sur animal anesthésié à l'isoflurane) et du poids. Si un animal présente une perte de poids anormale, ou un comportement suspect indiquant un mal-être ou une douleur ou atteint le point limite (annexe) il sera euthanasié (dislocation cervicale sous anesthésie) dans les plus brefs délais.

**8718** Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique avec environ 300 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde et risquant de développer une cirrhose voire un cancer du foie. Aujourd'hui, environ 1 million de décès/an dans le monde sont dus aux conséquences hépatiques de l'infection chronique par le VHB. Le traitement actuel le plus utilisé est un traitement « à vie », basé sur des analogues de nucléosides permettant de contrôler la réplication virale et l'évolution de la maladie mais ne permettant pas l'élimination du virus, qui persiste dans les cellules infectées. Dans ce contexte, il existe un réel besoin médical de développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment de type immunothérapie, qui permettraient d'induire une réponse immunitaire cellulaire appropriée. Cette dernière conduirait à l'élimination du virus via des mécanismes non-cytolytiques et cytolytiques, qui inhiberaient la réplication virale, détruiraient les hépatocytes infectés et supprimeraient de fait l'infection chez les patients porteurs chroniques du VHB.

Le laboratoire développe un produit d'immunothérapie basé sur un vecteur viral non répliquatif codant pour des antigènes du VHB. Dans l'attente des 1ers résultats d'études cliniques et afin d'optimiser l'efficacité du produit pour permettre de traiter une large population de patients atteints d'hépatite B chronique, des produits de 2ème génération sont en cours de développement. Il est donc nécessaire d'évaluer ces nouveaux produits basés sur un nouveau vecteur viral dans des études précliniques chez la souris afin d'évaluer leur immunogénicité ie leur capacité à induire une réponse immunitaire ad hoc susceptible d'exercer un effet antiviral.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la réponse immunitaire cellulaire et humorale observée chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer de façon efficace la capacité de différents produits d'immunothérapie à induire des réponses immunitaires spécifiques contre le VHB et de les comparer entre eux. A l'heure actuelle, aucun modèle in vitro ne peut se substituer au modèle murin pour notre étude. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de

l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier. Ce projet inclura un maximum de 704 souris.

**8719** Le virus Zika (ZIKV) est un arbovirus (transmission principalement par les moustiques de type Aedes) découvert en 1947 qui est aujourd'hui particulièrement médiatisé en raison de son implication dans une épidémie majeure qui a débuté en 2015 et dont l'épicentre se situe en Amérique Latine, principalement au Brésil. Dans la majorité des cas (70 à 80 %) l'infection est asymptomatique, cependant chez certains patients une fièvre modérée, une éruption cutanée, des conjonctivites et des douleurs musculaires peuvent apparaître. De façon plus inquiétante, des complications neurologiques ont été mise en évidence, en particulier des cas de microcéphalies résultant probablement de l'infection par le virus de femmes au premier ou au deuxième trimestre de grossesse. Par ailleurs des syndromes de type Guillain-Barré (associé à une démyélinisation) ou des inflammation de l'encéphale ont également été répertoriés chez des patients dont l'infection est avérée. L'ampleur de l'épidémie actuelle laisse apparaître l'état très limité des connaissances concernant la physiopathologie de ce virus. Ainsi un effort à l'échelle mondiale est en train d'être entrepris afin de caractériser au plus vite l'interaction moléculaire de ce virus avec les cellules humaines mais également de développer des tests diagnostiques spécifiques et des approches vaccinales.

Le virus Usutu (USUV) est également un arbovirus, présent aussi chez certains oiseaux tels que les merles ou les corbeaux. Proche phylogénétiquement du virus ZIKV, contrairement à ce dernier, ce virus émergent découvert en 1959 en Afrique du Sud n'est, pour l'heure, pas impliqué dans des épidémies chez l'Homme, mais des cas sporadiques ont été rapportés en Afrique et plus récemment en Europe incitant à la prudence concernant l'émergence de ce virus chez l'Homme.

Notre équipe a obtenu des résultats intéressants sur le potentiel neurotropique de ces deux virus émergents en utilisant des cultures in vitro de cellules neuronales (cellules souches neuronales, neurones moteurs, astrocytes). Il reste maintenant notamment à confirmer ces résultats sur des modèles in vivo, indispensables pour valider nos observations afin notamment de mettre en évidence un éventuel transport axonal de ces virus ainsi que d'étudier leur rôle dans le déclenchement d'un processus inflammatoire et dans la dégénérescence axonale associés à certains cas cliniques. L'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre les neurotropismes de ces deux virus et les voies d'accès au système nerveux central.

Notre projet doit inclure 280 animaux. Les animaux seront manipulés en confinement A2 en respectant les règles en vigueur dans l'animalerie d'accueil (portoirs ventilés suivant les manipulations effectuées, traitement de la litière comme déchets infectieux, formation du personnel manipulant les animaux ...)

Afin de correspondre à la règle des 3R nous mettrons en place les procédures suivantes :

#### 1. Réduction

- Les données seront analysées par un biostatisticien afin de minimiser le nombre d'animaux.

Par ailleurs les mêmes animaux seront utilisés pour effectuer à la fois les analyses histochimiques et biochimiques. Les expériences d'injections et l'euthanasie des animaux seront toujours effectuées par le même utilisateur afin de limiter la variabilité expérimentale et minimiser le nombre d'animaux utilisés. Les moelles épinières et nerfs sciatiques disséqués pourront aussi être observés en IRM de diffusion ex vivo afin d'évaluer le degré de démyélinisation.

#### 2. Remplacement

Une partie du projet sur modèles cellulaires (astrocytes, neurones moteurs, cellules souches neuronales, microglie) dans le but d'effectuer une première identification des gènes potentiellement impliqués dans le neurotropisme et l'inflammation initiée par ZIKV et USUV. Ces gènes candidats seront étudiés en priorité sur nos animaux. Le transport axonal sera également étudié in vitro en utilisant des chambres microfluidiques permettant de compartimentaliser le corps cellulaire du neurone de son axone.

#### 3. Raffinement

- La procédure la plus douloureuse de ce projet est l'injection dans le nerf sciatique des virus ZIKV et USUV. Elle sera effectuée sous anesthésie à l'isoflurane 2.5%.

Les opérations seront réalisées le matin afin de surveiller le réveil et l'état des animaux jusqu'en début de soirée. L'évaluation clinique de chaque souris sera réalisée par le responsable tout au long de l'expérience.

-Le palier de douleur prévisible à une injection dans le nerf sciatique est de degré 2 (modéré) car les douleurs post-opératoires sont estimées d'intensité moyenne sur une période courte. Nous utiliserons comme analgésique la buprénorphine à la dose de 0,1 mg/kg en sous cutanée. La buprénorphine devrait agir environ 6h, avec une première injection le matin lors de l'acte chirurgical, permettant ainsi de refaire une injection le soir si il y a manifestation de douleur.

Tout animal présentant des signes de morbidité sera exclu de l'expérience et immédiatement euthanasié par injection létale de pentobarbital avant la fin de l'expérience. Afin de déterminer le point limite de notre expérience aboutissant au sacrifice de nos animaux nous nous baserons sur un ensemble d'observations pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux de laboratoire, en se basant sur l'évaluation de 4 aspects de l'état d'un animal :

1. Variation du poids de l'animal (et variations connexes au niveau de l'ingestion de nourriture et d'eau). Tous les animaux subissant une perte de poids de plus de 20% seront sacrifiés. Notre étude s'effectuant sur le court terme, il ne devrait pas y avoir de perte de poids conséquentes chez nos animaux.

2. Apparence physique externe. Incluant notamment l'aspect du poil des animaux.

3. Signes cliniques mesurables. Exemples : changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux ci.

4. Changement dans les comportements non provoqués. Observation de la prostration éventuelle de l'animal dans la cage.

**8720** Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

Le cancer affecte des millions de personnes chaque année. Cette pathologie a donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les cellules cancéreuses ont la capacité de se propager de leur site original et de coloniser d'autres tissus ou organes. La présence de métastases est un paramètre utilisé pour définir le stade du cancer et est associé avec un mauvais pronostic. Les cellules cancéreuses peuvent migrer vers d'autres sites à travers les nœuds lymphatiques ou le compartiment sanguin. Pour mimer le phénomène courant et virulent des métastases, l'outil le plus utilisé est l'implantation de cellules cancéreuses directement dans la circulation systémique. Dépendant du site d'injection et du tropisme des cellules, des métastases expérimentales vont se former à différents sites, distants du site d'injection. La voie d'injection la plus communément utilisée est la voie intraveineuse dans la veine de la queue de la souris. Les cellules vont alors coloniser principalement le poumon et former des foci métastatiques aisément dénombrables. Pour ce modèle, les animaux sont euthanasiés 15-18 jours après l'injection des cellules. L'injection des cellules cancéreuses peut également se faire par voie intrapéritonéale (IP) où les cellules vont se disséminer et s'établir à différents endroits comme par exemple au niveau des surfaces péritonéales, du tractus gastrointestinal, du foie ou encore au niveau du système reproducteur. Après euthanasie des animaux, la localisation/dissémination, le volume et le poids des métastases excisées seront déterminés. De plus, la présence d'ascites liquides sera notée. Pour ce modèle, les animaux seront sacrifiés quand la charge tumorale sera évidente. Si aucune formation de métastases ne semble évidente, les animaux seront euthanasiés 90 jours maximum après la greffe. Malgré la prévalence et le mauvais pronostic associé aux métastases, des thérapeutiques efficaces sont manquants dans le traitement ou la prévention de ce phénomène. Avec ces modèles, il est possible de mesurer les effets relatifs de nouvelles molécules sur le développement des métastases cancéreuses. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Les retombées attendues

incluent le screening in vivo de nouvelles molécules efficaces, l'étude si besoin de leur mécanisme d'action et l'évaluation des meilleurs candidats avant une éventuelle utilisation en clinique chez l'homme.

L'utilisation de la souris comme modèle d'étude permet de tester le traitement dans un contexte physiologique. Notamment, en fonction de l'origine murine ou humaine des cellules cancéreuses greffées, ce projet sera réalisé sur des souris immunocompétentes ou immunodéficientes (pour s'affranchir de l'impact du système immunitaire de la souris sur le développement de la xéno greffe de cellules humaines), respectivement.

Différentes lignées cancéreuses pourront être utilisées en fonction de leur pouvoir métastatique et de l'indication ciblée par le traitement à tester (tableau 1). Les composés dont l'efficacité potentielle sera testée dans ce modèle auront fait l'objet auparavant d'autres études afin de limiter l'expérimentation animale au maximum et de se concentrer uniquement sur les molécules avec une réelle potentialité et/ou pertinentes pour les études mécanistiques.

Il est estimé que 1200 animaux seront nécessaires pour réaliser 30 études pendant une durée de 5 ans (tableau 2). Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 6 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an.

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

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

Pour les expérimentations, il a été prévu un nombre suffisant d'animaux en accord avec la littérature existante, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement. Ce protocole ne sera mis en place qu'avec des molécules thérapeutiques qui auront montré une efficacité lors d'études précédentes afin de limiter l'utilisation des animaux.

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

Les souris seront suivies quotidiennement (5 jours par semaine puis tous les jours pendant la phase évolutive) pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement de la souris (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps (qui sera mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, l'état du pelage le cas échéant, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Ce projet se focalise sur un modèle intégré nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie d'un organisme entier permettant le développement la dissémination de métastases. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant ces procédures expérimentales. Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux pour pouvoir tester l'effet anti-métastatique de traitements dans un contexte physiologique.

**8721** La toxoplasmose, causée par le parasite *Toxoplasma gondii*, est une des maladies parasitaires les plus répandues dans le monde, représentant un risque majeur chez la femme enceinte primo-infectée et chez les sujets immuno-déprimés. En effet, depuis l'émergence de la toxoplasmose cérébrale chez les Sidéens et les individus immuno-déprimés lors de greffes d'organes, il est apparu indispensable de rechercher les composants moléculaires intervenant dans le contrôle de l'infection chronique. De plus, il a été récemment démontré que la présence de kystes parasitaires latents dans le cerveau des individus immuno-compétents est responsable de l'apparition de maladies mentales et neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. De manière générale, la caractérisation fonctionnelle de nouveaux facteurs de virulence parasitaires se fait par des études principalement menées sur des lignées cellulaires primaires ou transformées cultivées in vitro. Cependant, l'importance de ces facteurs dans le pouvoir de dissémination du parasite et l'établissement de la forme chronique latente dans les muscles et le cerveau ne peut s'examiner que par l'utilisation d'un modèle d'infection de la souris, qui représente un hôte naturel du parasite. Ainsi, l'utilisation de la souris comme modèle d'infection nous permet de valider des cibles potentielles pour le développement de drogues anti-parasitaires. De plus, la physiopathologie et le tropisme des différentes souches de *T. gondii* pour les différents organes ne peuvent s'examiner que chez la souris.



L'objectif du projet est d'étudier l'impact de la réponse du réticulum endoplasmique au stress UPR (Unfolded Protein Response) lors de la toxoplasmose aiguë et durant l'établissement de la toxoplasmose cérébrale, et en particulier, d'évaluer la contribution de certaines voies de signalisation de l'hôte dans la pathogénicité des parasites in vivo chez la souris. Nous nous intéressons également aux rôles joués par certains facteurs parasitaires sécrétés dans la cellule hôte, déjà connus pour moduler les réponses pro-inflammatoires au sein des cellules immunitaires et donc la mise en place de la réponse protectrice à long terme.

Afin de minimiser le nombre de souris utilisées pour la réalisation de ce projet (1868 au total sur les prochaines 5 années), l'analyse de nombreux paramètres expérimentaux se fait simultanément sur une même souris après prélèvement des différents organes (rate, foie, cerveau, sang). De plus, différentes mesures sont prises pour réduire le stress, l'inconfort et la douleur pendant l'expérience : les animaux manipulés sont isolés dans une pièce séparée afin d'éviter tout stress aux animaux non manipulés ; les souris ne sont pas soumises à des prélèvements répétitifs mais à un prélèvement unique à la fin de la procédure expérimentale après sacrifice.

De plus, après infection par *T. gondii*, les animaux sont surveillés quotidiennement afin de détecter les signes éventuels de souffrance le plus tôt possible. Les points limites que sont les signes traduisant une souffrance significative (diminution de l'exploration, poil hérissé, prostration) entraîneront un sacrifice par dislocation cervicale de l'animal après anesthésie à l'isofluorane 2% ou une euthanasie par un agent gazeux, le CO<sub>2</sub>.

**8722** Les formations réglementaires à l'expérimentation animale (niveau concepteur pour les chercheurs ; niveau applicateur pour les techniciens de laboratoire) sont approuvées par le Ministère de l'Agriculture (renouvellement obtenu pour 5 ans).

Ces formations ont comme objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel impliqué dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant.

Ainsi, ces formations suivent un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) avec des conférences (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de ce dossier, seules les séquences pédagogiques utilisant des lapins sont décrites, à savoir :

Séance de TP de maniement, contention, prélèvements et administrations

Séance de TD-TP d'anesthésie

En fin de formation, nous recherchons, auprès de nos collègues au sein de notre établissement, si une opportunité se présente pour replacer les animaux soit en trouvant une famille d'accueil pour adoption soit utiliser les animaux euthanasiés à des fins pédagogiques.

Le nombre de stagiaires par session de formation est variable d'une session à une autre et se trouve généralement de 15 à 25 (moyenne de 20 stagiaires). Les formations sont organisées 3 fois par an en associant un groupe de concepteurs et un groupe d'applicateurs, ce qui correspond à un nombre total d'animaux utilisés sur 5 ans de 180 lapins.

Dans le cadre de la règle des 3R, il n'est pas possible de ne pas utiliser d'animaux pour former les futurs expérimentateurs, malgré le développement dans nos formations de méthodes alternatives sur mannequins d'animaux pour débiter les premiers actes de contention et d'administration. Le nombre d'animaux est réduit au minimum possible tout en permettant à chaque stagiaire de pouvoir s'exercer selon ses besoins de procédures expérimentales. En terme de raffinement, les actes légèrement invasifs réalisés sur animaux sont effectués après anesthésie locale afin de diminuer le stress et le risque de souffrance des animaux.

**8723** Les myopathies centronucléaires sont un groupe de maladies génétiques humaines rares touchant le muscle, liées à des mutations dans différents gènes, ayant en commun des lésions morphologiques du muscle typiques, une faiblesse et une hypotrophie musculaires, ainsi qu'une altération du couplage excitation-contraction. Parmi les gènes en cause, une mutation gain de fonction du gène codant pour la dynamine 2 (DNM2) est responsable de formes autosomales dominantes. Récemment, il a été démontré sur des modèles in vitro et dans des modèles murins, que la répression du gène DNM2 permet d'apporter un bénéfice thérapeutique, non seulement dans le cas de la myopathie

centronucléaire liée à DNM2, mais aussi dans d'autres formes de myopathies centronucléaires. Cette approche pourrait donc constituer une thérapie génique commune pour tout ce groupe de maladies, bien que liées à des mutations dans des gènes différents. Récemment, un cas de myopathie centronucléaire a été identifié chez un chien Border Collie de compagnie âgé de deux ans, présentant une atrophie musculaire et une faiblesse locomotrice. La mutation en cause a été identifiée et se trouve dans le gène DNM2. Elle est identique à la mutation la plus fréquemment diagnostiquée chez les patients humains. De par l'intérêt potentiel de cette mutation canine, et dans l'optique d'un essai préclinique de thérapie génique à haut potentiel de translation chez le patient humain, du sperme de ce chien a été prélevé et congelé. Le présent projet a pour objectif de générer une colonie de chiens porteurs de cette maladie, à partir de croisements entre des chiennes beagle et la semence congelée du chien Border Collie. Dans un souci de raffinement, nous caractériserons la maladie chez les animaux de cette descendance grâce à des outils d'évaluation non-invasifs, adaptés aux chiens, et pour la plupart également utilisés en clinique chez les patients atteints de ces maladies. Nous effectuerons également des biopsies musculaires, sous anesthésie générale avec un protocole d'analgésie adapté. La caractérisation fine de cette maladie permettra une prise en charge optimale de ces animaux, et une meilleure connaissance de la variabilité phénotypique inter-individuelle, indispensable à la conception d'essais thérapeutiques précliniques robustes. Les animaux seront suivis durant deux ans. Un maximum de 70 chiens est prévu pour ce projet, dont 6 mères beagle, et 64 chiots (dont la moitié atteints) sur trois générations. Cet effectif annoncé sera probablement réduit car seuls un ou deux chiens mâles malades à la première et seconde génération suffiront pour engendrer la génération suivante (prélèvement et cryopréservation de semence). Cette myopathie, bien que semblant modérée chez le chien border collie, sera prise en charge chez les animaux malades par un suivi vétérinaire étroit permettant d'anticiper et d'éviter toute souffrance potentielle. Les chiens seront hébergés en petits groupes d'animaux, auront des jouets divers à leur disposition, et bénéficieront d'une sortie quotidienne en groupes avec jouets et pataugeoires. Les étapes d'amont ayant déjà été réalisées sur des cultures cellulaires et dans des modèles murins, le modèle canin qui sera caractérisé grâce à ce projet permettra d'obtenir le socle préclinique pour préparer l'essai clinique de thérapie basée sur la répression de DNM2. Parmi les 32 chiens (dont 16 malades) de la troisième génération, se trouveront probablement les premiers chiens traités par cette stratégie, qui fera l'objet d'une nouvelle demande d'autorisation.

**8724** Ce projet de recherche fondamentale vise à mieux comprendre les effets de nouvelles molécules impliquées dans le traitement des patients diabétiques sur les complications vasculaires.

En effet, en 2015, 415 millions de personnes souffrent du diabète et ce nombre atteindra 642 millions en 2040 (<http://www.diabetesatlas.org/>). 1/3 des patients diabétiques développent des pathologies secondaires, notamment dans les yeux (rétinopathie) dont 1/10 menacent la vision. La rétinopathie diabétique est la complication vasculaire la plus courante du diabète. Même si l'amélioration de la prise en charge et des soins a permis de réduire la prévalence et l'incidence de la rétinopathie, cela reste un problème majeur en raison de la hausse de la prévalence du diabète au niveau mondial.

Une nouvelle classe de molécules est actuellement devenue référence dans le traitement de diabète de type 2 et son efficacité est très bien documentée. Cependant, en plus de leurs bienfaits thérapeutiques, des effets cardiovasculaires directs sont également décrits dans la littérature. Cependant, peu d'études ont exploré le rôle de ces thérapies sur les vaisseaux sanguins, particulièrement dans l'œil, car ces molécules pourraient affecter le développement de l'œdème maculaire et la rétinopathie proliférative. Il doit donc être caractérisé.

Notre objectif est de fournir la preuve de concept que ces molécules régulent l'angiogenèse et d'identifier les mécanismes responsables de cet effet dans les cellules endothéliales.

Ainsi, nous avons commencé cette étude par la mise au point des modèles *in vitro* d'angiogenèse en 3-Dimensions qui nous ont permis de définir le rôle de ces molécules sur la régulation et l'angiogenèse.

Néanmoins, cette étude ne peut être menée uniquement *in vitro* puisque l'angiogenèse régule et est régulée par de multiples échanges fonctionnels entre cellules endothéliales et cellules du microenvironnement. Notre projet nécessite par conséquent le recours à un modèle animal, qui intègre plusieurs composantes cellulaires et extracellulaires. Nous travaillerons donc sur un modèle

de souris. nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, déficiente pour le récepteur de ces molécules. Nous comparerons les atteintes vasculaires dans l'œil de ces souris, en réponse à ces traitements chez les souris de type sauvage et les souris génétiquement modifiées.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les injections de ces molécules afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3). Le suivi quotidien des animaux permettra de réduire le nombre de souris utilisées.

Le nombre total de souris permettant de mener à bien cette étude sera de 144 souris. L'ensemble des conditions d'hébergement a été validé par la structure bien-être de l'animal, constituée au sein du centre de recherches.

**8725** La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. 1350 souris seront utilisées. Les objectifs principaux de ce protocole sont triples : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur conditionnée chez le rongeur vigile, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur apprises à la suite du conditionnement et de l'extinction de la peur conditionnée et troisièmement l'étude des propriétés physiologiques des neurones par des approches électrophysiologiques in vitro sur tranche de cerveau frais. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un analogue des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telle que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress posttraumatique.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vitro telles que la culture cellulaire ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 1350 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées. Nous appliquons également systématiquement un traitement antalgique (Métacam, 0.01 ml, 5mg/ml, i.p.) avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie gazeuses (isoflurane)

Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points finaux établis sur la base de la grille d'évaluation de Morton et Griffith établie en 1985. Cinq aspects sont évalués au cours de nos expériences et nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique (est-ce qu'il se toilette correctement et le poil a-t-il un aspect brillant), les signes cliniques observables que sont la fréquence cardiaque et respiratoire, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux. Chaque critère est évalué de 0 à 3, si un critère obtient un score de 3, ceci induit un arrêt immédiat de l'expérience et l'euthanasie de l'animal.

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

**8726** Ce projet consiste à utiliser les ovocytes de xénope (*Xenopus laevis* : un amphibien d'un genre distinct de la grenouille) pour étudier les mécanismes impliqués dans la division des cellules. Ces ovocytes sont pondus par la femelle xénope et sont récupérés pour réaliser des extraits acellulaires à partir desquels les expériences sont effectuées. Occasionnellement, nous euthanasierons des mâles, afin de récupérer les spermatozoïdes qui nous fournissent l'ADN nécessaire pour reconstituer des noyaux et/ou des chromosomes dans nos extraits acellulaires.

Les ovocytes d'amphibien sont utilisés depuis une trentaine d'années pour étudier le cycle cellulaire et la dynamique des microtubules, qui sont deux événements cellulaires dont la dérégulation favorise l'apparition de cancers. Ce modèle est complémentaire des modèles comme la levure, la drosophile, et la culture des cellules de mammifères (souris ou homme). Ces ovocytes ont plusieurs atouts, notamment car ils sont pondus en grande quantité et à un stade précis du cycle cellulaire. Lors d'une ponte nous récupérons environ 2000 à 3000 ovocytes qui nous permettent de réaliser des extraits qui seront aliquotés et conservés à -80°C afin de réaliser plusieurs expériences. Le nombre d'animaux que nous souhaitons acheter au cours de ces 60 prochains mois est de 220 (200 femelles et 20 mâles). Les 200 femelles nous permettront de réaliser la totalité des expériences, et nous utiliserons également 20 mâles. Les mâles sont euthanasiés selon les protocoles en vigueur. Après la ponte, les femelles sont mises au repos pendant 6 mois ou plus en fonction des besoins avant de les remettre en situation de ponte.

Concernant la règle des 3R : nous avons réussi à réduire le nombre d'animaux en partageant les pontes entre équipes de recherche. Cela est possible lorsque nos expériences nécessitent des extraits frais, mais en petite quantité.

Comme stratégie de remplacement, nous multiplions le développement d'expériences alternatives réalisées *in vitro* ou en utilisant un modèle de levure.

Pour le raffinement, nous avons grandement amélioré les conditions d'accueil des amphibiens en construisant une nouvelle animalerie qui bénéficie des meilleures conditions pour que les animaux soient le moins stressés possible : (i) appareillage neuf et spécifique provenant de chez un fournisseur agréé, (ii) diversification de l'alimentation en offrant un complément alimentaire contenant des vers, grâce à l'installation de nouveaux tuyaux en PVC de 500 mm, (iii) conditions de séjour dans 2 pièces climatisées et isolées l'une de l'autre afin d'éviter que l'expérimentation interfère avec le repos des animaux, (iv) formation spécifique des animaliers à l'animalerie aquatique, et aux soins lorsque cela est nécessaire. Enfin, nous avons mis en place un service d'astreinte journalier (incluant week-end et jours fériés) qui permet de détecter rapidement tout animal en souffrance.

**8727** La recto-colite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn sont des maladies chroniques inflammatoires en constante augmentation dans les pays développés et en forte incidence dans les pays émergents. Les lésions inflammatoires sont localisées au niveau de l'intestin, du rectum et du côlon. Il n'existe pas de traitements curatifs mais seulement suspensifs. Les maladies évoluent souvent par poussées inflammatoires successives intercalées de périodes de rémission plus ou moins longues.

CD31 ou PECAM1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée de manière constitutive par les leucocytes mais aussi les cellules endothéliales et plaquettes sanguines. Des études menées dans notre laboratoire montrent que l'interaction homophile entre ces molécules : 1) délivre un signal de survie aux cellules endothéliales, 2) déclenche un signal inhibiteur empêchant l'activation des leucocytes (y compris les neutrophiles), 3) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-plaquettaires. Cependant, les cellules clivent une partie du domaine extracellulaire du CD31 lors de leur activation, ce qui provoque une annihilation des propriétés citées précédemment. Notre laboratoire a conçu et breveté un peptide rétro-inverso synthétique homotypique à la séquence CD31 qui a pour rôle de restaurer les fonctions du CD31.

Etant donné le rôle immunorégulateur de ce peptide de synthèse démontré dans de nombreux modèles inflammatoires, nous souhaitons tester son potentiel thérapeutique dans un modèle de colite chez la souris. Pour modéliser la colite, nous utiliserons le DSS (Dextran de Sulfate de Sodium), un inducteur connu et largement utilisé. Le DSS est un agent avec des effets toxiques directs sur l'épithélium du côlon et qui peut être administré dans l'eau potable à des souris dans des cycles multiples pour créer un état inflammatoire chronique.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3 R : remplacer et raffiner les modèles d'études actuels afin de réduire le nombre d'animaux inclus dans des protocoles expérimentaux. Aucune lignée cellulaire ne pourrait actuellement être substituée aux modèles animaux dans le cadre de ces études physiopathologiques. Pour ce projet, nous estimons que 192 animaux seront utilisés. Tout au long des procédures expérimentales, les souris seront surveillées quotidiennement afin de déceler si les animaux atteignent les points limites. Le cas échéant, l'euthanasie des animaux sera appliquée.

La durée globale de cette étude est de deux ans.

**8728** L'hyperplasie congénitale des surrénales (environ 1 cas pour 14000 naissances) est due à un dysfonctionnement des glandes surrénales, qui servent à produire plusieurs hormones essentielles. Héritaire, la maladie est due à des mutations du gène CYP21 qui créent un déficit de l'enzyme surrénalienne 21-hydroxylase (21-OH). Ces mutations bloquent la synthèse de deux hormones, cortisol et aldostérone. L'hypocortisolémie induite stimule l'hypophyse qui, pour compenser, fait grossir les surrénales, mais au lieu de produire cortisol et aldostérone, les surrénales produisent des quantités importantes d'androgènes, entraînant une virilisation chronique des personnes de sexe féminin.

Dans les pays développés, la maladie est dépistée chez les nouveau-nés car, depuis les années 1950, il existe un traitement qui, démarré précocement, permet de limiter les signes de virilisation et le risque vital éventuel. Il consiste à administrer des hormones de substitution à vie mais a de nombreux effets indésirables (obésité, ostéoporose, croissance freinée) et n'évite que très imparfaitement la virilisation. Dans les formes sévères, des interventions chirurgicales répétées sont nécessaires pour corriger la virilisation du clitoris. Le développement de nouvelles thérapeutiques est donc essentiel.

L'objectif de notre projet est d'étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique consistant à transférer une version fonctionnelle du gène CYP21 dans les surrénales. Si l'expression de CYP21 peut être obtenue et maintenue, elle guérira la maladie définitivement.

Nous validerons tout d'abord les outils de thérapie génique sur des souris de type sauvage par injection intraveineuse. Toutefois, la très petite taille des surrénales de souris, qui ne fabriquent pas exactement les mêmes hormones que l'Homme, ne nous permet pas d'extrapoler directement l'usage de ce vecteur en clinique, nous aurons donc également recours à des primates non-humains (PNH). Du fait de leur proximité physiologique avec l'Homme pour la fonction surrénalienne, de la taille de leurs surrénales ainsi que de leur régulation hypophyso-surrénalienne similaire à l'Homme, nous utiliserons les PNH pour l'étude d'expression intrasurrénalienne et de tolérance des vecteurs thérapeutiques porteurs de CYP21, après injections intrasurrénales ou intraveineuses.

Enfin, l'effet thérapeutique des vecteurs efficaces chez le PNH sera confirmé sur des souris déficientes en CYP21, qui peuvent être guéries par l'expression surrénalienne du gène CYP21. Nous validerons ainsi leur capacité à guérir la maladie, ce qui ouvrira la voie à l'expression correctrice du gène chez les patients.

Pour pouvoir effectuer des tests statistiques (Anova, tests non paramétriques type Mann-Whitney et Kruskal-Wallis), étant donnée la variation entre individus, les études seront réalisées telles que :

1) Validation fonctionnelle chez la souris sauvage : 3 vecteurs à valider, 2 doses à tester (dose publiée par le laboratoire puis demie dose), 6 souris / groupe et 12 souris contrôles (48 souris).

2) Ciblage par injection intrasurrénalienne chez le PNH : 3 vecteurs à tester, 2 PNH / vecteur (6 PNH), 1 PNH supplémentaire pour déterminer la plus petite dose efficace (meilleur des 3 vecteurs au quart de la dose utilisée précédemment).

3) Ciblage par injection intraveineuse chez le PNH : 3 vecteurs à tester, 2 PNH / vecteur (6 PNH), 1 PNH supplémentaire pour déterminer la plus petite dose efficace (meilleur des 3 vecteurs au quart de la dose).

4) Validation thérapeutique chez la souris CYP21 -/- : 1 vecteur, 3 doses à tester (dose publiée par le laboratoire, demie dose et double dose pour avoir un effet dose-réponse), 10 souris / groupe et 10 contrôles (40 souris).

La distribution des vecteurs et l'expression du gène seront suivies. Pour le vecteur le plus efficace, les effets thérapeutiques seront étudiés chez la souris malade modèle, notamment en suivant la quantité d'hormones dans le sang, le comportement des animaux et la structure des surrénales.

Réduction :

La constitution des groupes (3 animaux/groupe chez le PNH et 6 à 10 /groupe chez la souris) est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des données statistiquement significatives permettant d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement et sa toxicité potentielle. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans être excessif en termes d'animaux à inclure (88 souris et 14 PNH au total).

Raffinement :

Des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale (injection intraveineuse ou intrasurrénalienne) se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux chez le primate, anesthésie gazeuse chez la souris). Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole d'anesthésie de courte durée (environ 10 min). L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques non-invasives (analyses d'urine, tests comportementaux). Des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus engendrant une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques n'auraient pas d'effet. Dans ce cas, le vétérinaire, présent quotidiennement sur site, sera alerté et mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés. L'état général et l'alimentation seront surveillés quotidiennement. Ils seront hébergés en groupe pour favoriser les interactions sociales. Le Centre de thérapie génique dispose d'un programme d'enrichissement pour les rongeurs et les macaques : distribution de jouets, de fruits frais et secs cachés dans la litière ou en hauteur, visionnage de films, aménagement de l'habitat (volières), par exemple chez le macaque.

Remplacement :

Cette étude ne peut être réalisée uniquement chez le rongeur car des différences nettes inter-espèces ont été mises en évidence concernant la transduction avec les vecteurs en thérapie génique. Les études chez le PNH apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité et de toxicité. De plus, il n'est pas possible de tester in vitro ou in silico l'efficacité thérapeutique d'une telle thérapie car sa validation requiert de corriger un système de régulation à l'échelle d'un organisme vivant, dont les fonctions endocriniennes font interagir surrénales et hypophyse (boucle homéostatique finement réglée).

**8729** 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 des animaux affectés, détérioration de la qualité des carcasses, élévation du taux de pertes et de saisies à l'abattoir, 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. Le transfert de gènes dans l'environnement et la chaîne alimentaire peut en effet favoriser le développement de bactéries résistantes aux traitements antibiotiques. *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) est l'agent initiateur de la pneumonie enzootique porcine. Des agents microbiologiques secondaires sont également impliqués ou présents, tels que deux autres mycoplasmes : *M. hyorhinis* (Mhr), responsable également de polysérites (inflammations simultanées de plusieurs enveloppes ou séreuses qui entourent certains organes) 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 de 3 souches de mycoplasmes isolées de pneumonie : seules et associées. Cette procédure permettra également de valider les nouvelles méthodes mises en place au laboratoire pour quantifier les trois espèces mycoplasmiques dans les tissus atteints ainsi que de disposer de sérums de porcs positifs vis-à-vis de ces trois espèces.

Quarante-huit porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés (porcs EOPS) âgés de 7 semaines d'âge seront utilisés (8 porcelets/lot, 6 lots). Les porcs seront inoculés par voie trachéale avec les différentes souches à étudier, seules (lot 2 : Mhp, lot 3 : Mhr, lot 4 : Mfloc) ou associées (lot 5 : Mhp à J0 puis Mfloc à J7, lot 6 : Mhp à J0 puis Mhr à J7), ou avec du diluant stérile pour le lot « témoin » (lot 1). Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible des symptômes cliniques (perte d'appétit ou de poids, hypo/hyperthermie, difficultés respiratoires ...). L'infection expérimentale avec Mhp, est quasiment asymptomatique (hormis une légère hyperthermie transitoire et la présence de toux environ 10 jours après l'infection). Mfloc seul ne devrait pas induire de symptôme. Il est possible que Mhr induise une hyperthermie et un peu de boiterie. Il n'est donc pas attendu de symptomatologie sévère lors de cette expérimentation. Si toutefois, l'infection conduisait à une altération importante de l'état de santé, les animaux concernés seraient euthanasiés. Ce plan expérimental est pensé de façon à minimiser le nombre de porcs utilisés tout en menant une étude suffisamment robuste pour avoir des résultats statistiquement significatifs. Il est en effet indispensable d'avoir au minimum huit animaux par lot pour considérer la variabilité inter-individuelle et pour avoir une pression d'infection suffisante pour reproduire la pneumonie. Les animaux seront logés en groupe. Ils auront à leur disposition des objets manipulables et auront accès à discrétion à de l'aliment et à de l'eau. Il n'existe pas d'alternative à cette étude expérimentale sur l'animal puisque nous cherchons à évaluer l'état de santé général de l'animal cible qu'est le porc ainsi que ses réponses immunologiques.

**8730** Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez le rongeur pour des candidats médicaments dont l'administration sera réalisée par perfusion intraveineuse avec implantation de cathéter.

Ces études peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluation précoce du profil toxicologique du candidat médicament : établir quels sont les organes cibles et les doses toxiques pour un organisme vivant.
- recherche des mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposition des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice risque à utiliser ces médicaments
- détermination du profil pharmacocinétique et sélection des molécules ayant les meilleurs profils parmi une série de molécules, ou comparaison du profil lors d'un changement de formulation ou de sel de la molécule
- comparaison des paramètres pharmacocinétiques de différentes formulations et/ou sels de molécule, pour vérifier la bonne exposition et permettre ainsi d'évaluer l'efficacité et la toxicité dans les études ultérieures,
- ajustement des doses et/ou du schéma expérimental des essais précliniques
- aide à l'interprétation des données pharmacologiques et toxicologiques

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives in vitro et in silico sont utilisées au préalable dans la caractérisation et la sélection des molécules dans les stades précoces du développement.

L'implantation de cathéter(s) vasculaire(s), réalisée au préalable sous anesthésie (avec tapis chauffant), selon les règles de l'art avec un protocole d'analgésie adapté au cas par cas, permet l'administration unique ou répétée par perfusion intraveineuse (sans contention manuelle de l'animal). L'implantation de cathéter vasculaire peut également permettre des prélèvements sanguins répétés, sans contention manuelle de l'animal.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1 j à 4 semaines, elles incluent des observations cliniques, des prélèvements sanguins pour mesure du taux de médicament dans le sang et ou vérification des paramètres hémato-biochimiques. Les prélèvements sanguins, sont adaptés en terme de volume et de fréquence conformément à la réglementation et réalisés avec les méthodes

les moins contraignantes possibles ; par exemple le microsampling. Des collectes d'urine sur des durées inférieures ou égales à 24h peuvent être également effectuées

Le nombre de rongeurs utilisé dans ces études est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés.

Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter toute souffrance inutile

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement des candidats médicaments en affinant le choix des doses et le schéma expérimental des études ultérieures de sécurité et d'efficacité.

Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation "in vivo", chaque année, un maximum de 500 rats et 250 souris pourra être utilisé.

**8731** Les objectifs de cette étude sont doubles : 1) établir un système expérimental permettant la quantification de l'activité neuronale suite à une stimulation sensorielle, en utilisant les senseurs calcique de dernière génération, et 2) utiliser ce système afin d'étudier le traitement de l'information sensorielle dans le néocortex d'un modèle murin (souris transgénique) de maladie neurodéveloppementale. Plus spécifiquement, nous souhaitons comprendre comment l'activité du néocortex est modifiée dans les conditions pathophysiologiques chez ce modèle transgénique de souris. Nous souhaitons également déterminer si ces modifications pathophysiologiques peuvent être améliorées en appliquant les molécules à haut potentiel thérapeutique. Les bénéfices attendus de notre projet de recherche sont une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents de cette maladie, et, à terme, l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer les symptômes de cette maladie, qui touche environ 1 sur 70 enfants.

En accord avec le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement), nous avons réfléchi à notre projet de recherche de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Réduction : afin de ne pas utiliser plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour que nos résultats soient validés par nos pairs, nous avons développé une stratégie d'expérimentation permettant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisé pour chaque expérience. Plus spécifiquement, nos expériences se dérouleront en deux étapes : une phase d'optimisation technique et une phase expérimentale. La première nous permettra d'identifier les meilleures conditions expérimentales afin de limiter - à long terme - la sur-utilisation d'animaux. Nous avons également pris le conseil d'un experte dans le domaine d'imagerie calcique in vivo, afin d'optimiser la planification de nos expériences selon le taux de variation attendu dans ce type d'expérience. En outre, notre stratégie d'expérimentation nous permettra de faire une évaluation précoce de la variabilité et de terminer nos expériences plus tôt si nous estimons que la taille échantillon proposée est trop importante. Raffinement : les animaux seront hébergés dans une manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Remplacement : Le projet porte sur l'étude du traitement de l'information sensorielle dans le néocortex. Il nécessite, donc, la présence de circuits intacts, permettant la transmission des signaux électriques entre le système nerveux périphérique et le système nerveux central et entre les différentes zones cérébrales. Le modèle animal est absolument nécessaire pour reproduire la complexité de ces interactions neuronales et ne peut pas être remplacé par les études in vitro ou in silico. Certaines études antérieures ont été réalisées chez la drosophile et le poisson zèbre. Cependant les systèmes sensoriels de ces organismes sont très différents de ceux des mammifères (ils manquent notamment un néocortex) et le remplacement par ces modèles n'est pas possible. Nous avons estimé le nombre maximum d'animaux nécessaire à ce projet à 283 souris.

**8732** Le cisplatine est une molécule couramment utilisée dans le traitement de divers cancers (ovaires, testicules, poumons, etc). Il s'agit d'un agent alkylant qui agit sur l'ADN des cellules cancéreuses, inhibant ainsi leur multiplication. L'un des principaux effets indésirables du cisplatine est l'apparition de nausées et/ou vomissements (1 à 4h après administration du cisplatine), impactant fortement le suivi et la tolérance des patients vis-à-vis de leur traitement. Ce projet a pour but d'évaluer l'efficacité pharmacologique de molécules anti-émétiques chez le chien après administration de cisplatine, et ce



afin de contrer son effet émétique. Cela permettrait ainsi un meilleur suivi et tolérance du patient vis-à-vis de son traitement anti-cancéreux.

Pour ce projet, le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 30 chiens sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R.

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur un modèle de nausées et vomissements induits par le cisplatine. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude du fait de sa forte ressemblance dans le système de déclenchement des nausées et vomissements par rapport à l'homme.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

**8733** Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche sur le diabète, pathologie qui se caractérise par une élévation anormale du taux de glucose dans le sang, et qui touche plus de 300 millions de personnes dans le monde, soit 6,6 % de la population adulte mondiale, d'après la Fédération Internationale du diabète. L'obésité est le principal facteur de risque pour le diabète de type 2, qui est caractérisé par une résistance des tissus (muscles, foie, tissus adipeux) à l'insuline associée à un défaut de sécrétion de l'insuline par le pancréas. Ainsi empêcher la mise en place des effets délétères de l'obésité et donc atténuer la résistance à l'insuline représente un enjeu majeur de la lutte contre le diabète de type 2.

Ce projet de recherche implique plusieurs souches de souris (C57BL6/J, DB1/2J, BALB/cJ) qui seront soumises à un régime hyperlipidique (HL) ou à un régime contrôle (RC), avec ou sans supplémentation à la carnitine dans l'eau de boisson. La carnitine est un complément alimentaire souvent utilisé par les sportifs afin de stimuler l'oxydation des graisses et permettre un bénéfice en terme d'augmentation du ratio "masse maigre/masse grasse". Certaines données génétiques obtenues chez la souris indiquent que l'expression des transporteurs membranaires de la carnitine est corrélée avec la glycémie à jeun, nous pensons donc mettre en évidence des effets protecteurs de la supplémentation en carnitine en terme de sensibilité à l'insuline, glycémie à jeun et concentration plasmatique en triglycérides. L'utilisation de 3 souches différentes de souris est nécessaire pour apprécier les effets différentiels de la carnitine selon le fonds génétique et notamment l'expression des transporteurs et enzymes impliqués dans le métabolisme de la carnitine. Un minimum de 8 souris par groupe sera nécessaire pour mettre en évidence les effets attendus, il y aura 4 groupes de régimes (HL, HL+ carnitine, RC, RC+ carnitine) et 3 souches de souris soit un total de 96 souris mâles.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autres moyens car l'étude de la sensibilité à l'insuline des tissus et l'impact sur la glycémie ne peut se faire qu'in vivo, et les souris sont un excellent modèle d'étude de l'homéostasie glucidique (physiologie et pathophysiologie très similaires à l'Homme). Cette étude utilisera le minimum de souris nécessaire et respectera le plus possible le bien-être animal (règle des 3R, raffinement des procédures et amélioration de leur environnement). Ainsi les animaux seront laissés en groupe de 4 par cage, un nid végétal leur sera proposé ainsi que des morceaux de bois (pour permettre l'usure des dents) et un cylindre de carton.

**8734** Chez les patients diabétiques et sclérodermiques, les altérations de la circulation sanguine cutanée provoquent des ulcérations cutanées chroniques diminuant ainsi la qualité de vie et pouvant conduire

à une amputation dans les cas graves. L'utilisation en clinique de vasodilatateurs par voie sanguine ou orale permet d'améliorer la cicatrisation mais leur utilisation provoque des effets systémiques comme l'hypotension qui peuvent amener à un arrêt du traitement.

Le traitement local des ulcères chroniques permettrait de réduire les effets secondaires liés au traitement et d'augmenter leur efficacité. Le passage sanguin d'un médicament lors d'une application sur un ulcère est fortement augmenté ce qui diminue l'action locale recherchée. Il faut donc des formulations permettant d'administrer de manière contrôlée la quantité de médicament sur un temps donné.

Les nanoparticules lipidiques représentent une innovation dans la formulation de médicament. Elles sont caractérisées par des nanoparticules de 1 à 100 nm de diamètre et composées de lipides biocompatibles non toxiques. L'utilisation de nanoparticules lipidiques permet de contrôler le relargage du principe actif et permettrait d'avoir une forte action locale par relargage progressif.

Cette étude permettra de caractériser le passage de principes actifs vasodilatateurs lorsqu'ils sont formulés dans des nanoparticules lipidiques et de préciser le protocole d'application lors de l'étape d'évaluation de la cicatrisation sur un modèle diabétique ou sclérodermique.

Lors du premier protocole, une application de 24 h sera réalisée et le passage systémique sera caractérisé par des prélèvements sanguins. Des prélèvements tissulaires seront réalisés ainsi qu'une mesure de l'efficacité du traitement par imagerie et de la toxicité du traitement par la quantification des effets systémiques secondaires. En fonction des résultats de cette première phase, une étape d'application à 72h pourra être réalisée pour caractériser le passage à des temps prolongés.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris car pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal (Culture cellulaire, peau de synthèse, simulation informatique) pour représenter l'application sur un ulcère cutané. Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés par la réduction du nombre de formulations à tester. La deuxième procédure sera réalisée uniquement si la première procédure est positive pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous utiliserons 120 souris entre les deux procédures expérimentales. Les animaux seront suivis pendant le traitement avec un traitement analgésiant adapté et des points limites adaptés.

**8735** L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes et d'identifier les structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un modèle des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telles que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress posttraumatique.

Les animaux subissent une chirurgie peu douloureuse. Une fois leur récupération complète, ils sont soumis à un événement désagréable (léger choc électrique non douloureux) qui induit un stress ponctuel. Cet événement est associé à un contexte particulier (la présentation d'un son). Le son est donc associé pour l'animal au choc électrique. Les souris sont ensuite exposées uniquement au son ; leurs réactions sont observées, ainsi que les structures cérébrales activées par ce phénomène de peur conditionnée.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connections neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 600 souris pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées :

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles. Les souris sont habituées à la manipulation ; elles ne sont donc pas stressées en présence de l'homme et lors des manipulations.

Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale. Un traitement antalgique est systématique ; il est administré avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux pour prévenir toute douleur. L'hébergement individuel des animaux est limité au maximum, et leur environnement est enrichi.

Pour limiter les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des critères d'observation qui permettent d'évaluer l'état de santé et le bien-être des souris. Si les points limites que nous avons fixés sont franchis, l'expérience est immédiatement interrompue et l'animal concerné est euthanasié.

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

**8736** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 98 jours.

Dans la production d'AcP, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**8737** Les nouvelles techniques de l'élevage de précision offre de nouveaux outils pour mesurer des paramètres biologiques. Ces nouvelles techniques sont intéressantes pour le suivi des animaux en condition d'élevage et veiller à leur santé et à leur bien-être. Les données d'abreuvement constituent un indicateur intéressant de l'état de l'animal et une condition importante du bien-être. Les thermobolus ruminiaux permettent actuellement de mesurer la température du rumen en continu notamment pour détecter des événements sanitaires. La température du rumen est fortement et rapidement abaissée par les buvées importantes des vaches laitières. L'idée de cet essai est d'utiliser cette information pour 1/ essayer d'évaluer les quantités d'eau bues à partir de ces chutes de température en modélisant cette baisse 2/ de voir si ce modèle ne permet pas également d'évaluer certains paramètres digestifs, comme le volume des contenus du rumen.

L'expérimentation sera conduite sur 4 vaches laitières pendant une durée de 2 semaines.

Le schéma expérimental sera réalisé sous forme d'un dispositif en rotation dans lequel l'animal est son propre témoin (carré latin) afin de limiter les nombre d'animaux. Ce schéma sera réalisé sur 4 jours consécutifs et répétés sur 2 semaines seulement. Les traitements consisteront à réaliser des buvées de volume (petit et grand volume) et de température (eau froide ou à température ambiante) fixés. Ces buvées (2 buvées expérimentales par jour) seront réalisées soient avant soit pendant les repas pour évaluer l'effet de production de chaleur. Les mesures consisteront à suivre la température du rumen avec des thermobolus du commerce. L'enjeu est ensuite d'arriver à modéliser ces cinétiques pour en extraire les paramètres importants pour la boisson et le volume du rumen.

Remplacer : Il n'est pas concevable d'étudier les fluctuations des températures corporelles et notamment celle de l'appareil digestif sans la mesurer sur des animaux, mais des simulations sur bain-marie seront conduites au préalable pour caler le modèle théorique de la réponse de température. Réduire : Les essais seront menés avec 4 vaches en carré latin pour que l'animal soit son propre témoin et pour réduire le plus possible le nombre d'animaux en gardant une puissance statistique suffisante pour montrer l'efficacité du principe. Raffiner : les animaux seront dans des conditions d'élevage permettant d'assurer leur bien-être et visités à minima deux fois par jour pour assurer la distribution de l'alimentation et effectuer la traite.

**8738** Un des effets néfastes de la nutrition parentérale est l'apparition de complications hépatiques associées à la nutrition parentérale (PNALD). La principale manifestation de cette pathologie est la stéatose hépatique.

Celle-ci résulte d'une infiltration de triglycérides dans les cellules hépatiques. La stéatose est susceptible d'évoluer vers d'autres pathologies telles que la fibrose et favorise l'apparition de cancers hépatiques. Elle constitue la première cause de maladie hépatique mondiale. Son traitement repose, en majorité, sur les mesures diététiques car l'efficacité des composés candidats est difficile à démontrer. Sachant que l'efficacité d'une substance candidate est caractérisée par l'effet induit dans un organisme, elle est donc déterminante dans le devenir de cette substance. C'est pourquoi, il est nécessaire d'évaluer le mécanisme d'action et l'efficacité en début de développement en utilisant un modèle approprié.

Ce projet se décline en deux grandes étapes :

-Développement et caractérisation du modèle de la stéatose chez le rongeur.

-Evaluation de l'efficacité de la substance candidate sur des rats en stéatose.

Les animaux sont hébergés en groupe durant la première étape tandis que dans la deuxième étape, les animaux sont hébergés individuellement. En effet, dans la deuxième étape, les animaux sont cathétérisés et reçoivent un traitement par perfusion continue. Le matériel utilisé et notamment les lignes de perfusion ne permettent pas un hébergement groupé (risque de coupure de ces lignes par exemple). L'hébergement individuel est mis en place à l'arrivée des animaux s'ils sont reçus cathétérisés. Dans le cas de la cathétérisation sur site, les animaux sont hébergés en groupe avant la chirurgie et sont ensuite hébergés individuellement.

La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des composés à tester. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme.

Du fait de la complexité que représente un organisme vivant et les interactions des différentes fonctions physiologiques qui le compose, il n'existe aucune méthode alternative in vitro et/ou in silico permettant de s'affranchir totalement de l'utilisation animale.

L'animal choisi est le rongeur car l'induction de la maladie est possible dans cette espèce et c'est l'espèce utilisée dans les études précliniques ultérieures.

Dans le cadre de ce projet, le nombre d'animaux est variable selon le protocole expérimental. Il est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement et ainsi atteindre tous les objectifs spécifiques de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé.

Dans le cadre de ce projet, le nombre total d'animaux nécessaire sur une période de 5 années est estimé à 820 rats. L'état de santé des animaux est contrôlé quotidiennement et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongée. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

**8739** Au démarrage de leur lactation, les vaches laitières sont confrontées à une augmentation très importante de leur besoin physiologique en calcium due à la sécrétion d'importantes quantités de calcium dans le lait. Cette augmentation des besoins en calcium est très rapide par rapport aux processus d'adaptation de l'organisme à la lactation. Dans certains cas, ces processus d'adaptation des vaches à la lactation sont insuffisants, ce qui se traduit par une diminution pathologique de la calcémie (teneur en calcium plasmatique) après le vêlage pouvant induire une fièvre vitulaire. Cette pathologie se traduit dans sa forme clinique par une faiblesse musculaire extrême détectable par le fait que l'animal ne se lève pas, tremble ou a du mal à marcher. Elle peut entraîner la mort si l'administration d'une forme de calcium rapidement assimilable n'est pas réalisée. L'objectif de cette étude est d'estimer si les variations de la teneur en calcium du lait dans les jours qui suivent le vêlage peuvent permettre de prédire des chutes de la calcémie et donc ces difficultés d'adaptation des vaches à la lactation. Si tel était le cas, l'analyse des teneurs en Ca du lait en début de lactation pourrait être une alternative aux prises de sang pour qualifier les états d'hypocalcémie d'après vêlage. Ce serait alors un outil précieux pour concevoir des stratégies de prévention de la fièvre vitulaire sous ses formes cliniques ou subcliniques, pour mesurer des prévalences d'hypocalcémies sub-cliniques dans les jours qui suivent le vêlage ainsi que pour qualifier leurs liens avec d'autres pathologies en début de lactation.

Pour ce projet, 30 vaches (20 multipares et 10 primipares) seront suivies pendant les deux mois qui entourent la période de vêlage pendant une première année. Ce suivi pourra être renouvelé sur 30

vaches supplémentaires l'année suivante si la variabilité souhaitée n'avait pas été atteinte. Des prises de sang et de lait seront réalisés en parallèle pendant les 2 semaines qui suivent la mise-bas. L'objectif de ce projet sera de déterminer, à travers l'observation de la variabilité individuelle, s'il est possible de mettre en évidence une relation entre les dynamiques des teneurs en calcium du lait et du sang. Le choix de vaches à la fois primipares et multipares permettra de vérifier que ces relations sont généralisables selon la parité car il est établi que les problèmes d'hypocalcémie pendant les jours qui suivent le vêlage augmentent avec l'âge de l'animal.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour définir si la teneur en calcium du lait peut être un indicateur d'une pathologie de la régulation du métabolisme calcique car il n'existe pas de modèle.

Réduire : Le nombre d'animaux impliqué en année 1 est le minimum possible. La réalisation de l'essai sur 2 ans permettra d'impliquer plus d'animaux en année 2 si la variabilité individuelle de la calcémie était insuffisante en année 1.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

**8740** L'épilepsie est une maladie neurologique fréquente, affectant 1% de la population. L'évolution de l'épilepsie temporale commence par des crises sévères suivies d'une phase silencieuse qui peut durer plusieurs années avant que des crises ne réapparaissent et s'aggravent au cours du temps. Elle s'accompagne d'une lésion caractéristique dans le cerveau et de troubles de l'humeur et de la mémoire. Les médicaments actuels sont inefficaces chez la majorité des patients (70%). Il est donc indispensable de rechercher des traitements innovants pour réparer la lésion cérébrale et améliorer les symptômes. Certains de ces traitements font déjà l'objet d'essais cliniques pour traiter d'autres pathologies du cerveau.

L'objectif principal du projet est donc d'évaluer les effets de nouveaux traitements dans un modèle de l'épilepsie temporale chez la souris, avant de les tester chez l'homme. Le modèle utilisé, très bien décrit depuis les années 1995, reproduit parfaitement la pathologie humaine. Il n'existe pas d'équivalent expérimental utilisant des systèmes in vitro ou de modélisations informatiques permettant d'étudier l'évolution des crises épileptiques et la mémoire. Il est donc indispensable d'utiliser des animaux vivants capables d'exprimer des troubles neurologiques et de réagir aux traitements.

Le nombre de souris nécessaires à cette étude a été calculé grâce à une planification précise afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Il a été estimé à 126 pour les 4 ans à venir. Ce nombre est un minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous avons une grande expérience dans la manipulation des animaux et la minimisation des conditions de stress auxquelles les animaux pourraient être soumis. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans des conditions de bien-être contrôlées, dans un milieu enrichi avec libre accès à la boisson et la nourriture. Nous surveillerons leur état de santé chaque jour pendant la durée des expérimentations. Pour toute intervention invasive, les animaux seront anesthésiés pour éliminer la sensation de douleur et des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés afin de réduire la souffrance à son minimum.

Nous nous attendons à ce que les traitements soient efficaces en réparant la lésion dans le cerveau et préviennent l'apparition des crises épileptiques et les troubles associés.

**8741** La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris. 450 souris C57BL6/J seront utilisées. Les objectifs principaux de ce protocole sont doubles : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur conditionnée chez le rongeur vigile et, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur apprises à la suite du conditionnement et de l'extinction de la peur conditionnée. L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un analogue des thérapies

d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telle que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress post-traumatique.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer : ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification des structures cérébrales et des circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal vigile. Des méthodes in vivo telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire : le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 15 souris par groupe, soit un total de 450 animaux pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner : afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées

A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'un nid végétal. Ces cages offrent aux animaux un espace important pour se redresser. A la suite de cette période d'acclimatation, les animaux sont placés en cages individuelles. Les souris sont habituées à la manipulation ; elles ne sont donc pas stressées en présence de l'homme et lors des manipulations.

Nous appliquons également systématiquement un traitement antalgique avant et trois jours suivant les actes chirurgicaux. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie gazeuses (isoflurane)

Pour identifier les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons définis des points finaux établis sur la base de la grille d'évaluation de Morton et Griffith établie en 1985. Cinq aspects sont évalués au cours de nos expériences et nous aident à déterminer un point final à l'expérimentation. Ces critères sont : la variation du poids de l'animal, son apparence physique, la fréquence cardiaque et respiratoire, les changements comportementaux non provoqués et la réponse à des stimuli environnementaux.

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

**8742** L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter la Maladie de Pompe (MP). Il s'agit d'une maladie neuromusculaire rare (prévalence de 1/40000) causée par une insuffisance de l'enzyme alpha-glucosidase acide (GAA), qui est localisée au niveau des lysosomes des cellules et qui convertit le glycogène en glucose. Le manque de GAA chez les patients provoque l'accumulation de glycogène dans plusieurs tissus conduisant à des lésions tissulaires. La MP affecte principalement les muscles et les neurones, causant des cardiomyopathies, des faiblesses musculaires et des insuffisances respiratoires. A ce jour, le seul traitement disponible pour la MP est la thérapie de remplacement enzymatique (ERT), qui est basée sur la perfusion hebdomadaire de la protéine GAA de synthèse dans la circulation sanguine. Dans ce projet, nous testerons l'approche de transfert de gènes comme moyen thérapeutique, et nous comparerons l'efficacité de cette stratégie à celle du traitement actuel, l'ERT.

L'ERT améliore les fonctions motrices et respiratoires. Néanmoins, l'efficacité de l'ERT est très variable chez les patients, et elle n'est pas capable d'éliminer le glycogène dans tous les tissus, laissant une maladie résiduelle. Le principal défi pour le succès de l'ERT est que la GAA de synthèse ne peut pas atteindre le muscle et le cerveau à des niveaux suffisants, et ceci est compliqué par la génération de titres élevés d'anticorps contre la protéine de synthèse, même en présence d'immunosuppression. Dans une étude antérieure, nous avons montré que la thérapie génique avec des vecteurs AAV portant le gène Gaa c'est une approche effective pour la MP dans le modèle souris.

La thérapie génique par AAV présente divers avantages par rapport à l'ERT. Le premier est qu'en fournissant une copie fonctionnelle du gène Gaa, il est possible de corriger la déficience de cette enzyme de manière permanente sans nécessiter de perfusions régulières de la protéine. En plus, notre vecteur AAV exprime la protéine dans le foie, ce qui induit une tolérance immunitaire vers le GAA et évite la génération d'anticorps. L'efficacité thérapeutique observé est le résultat de l'absorption de GAA par tous les tissus liés à la maladie, ce qui est difficulté par l'accumulation de GAA dans le foie, la baisse absorption par le muscle, et la dégradation de la protéine dans la circulation en raison d'évènements tels que la réponse immunitaire et la dénaturation de la protéine. Donc, la quantité de GAA qui arrive aux tissus affectés déterminerait la réduction de l'accumulation de glycogène et l'amélioration du phénotype musculaire à long terme. Pour cette raison, nous pouvons seulement évaluer la véritable efficacité des deux traitements que dans un organisme complexe tel qu'une souris, dans lequel l'interaction de tous ces événements a lieu. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris qui présente les mêmes déficiences observées dans la MP. Afin de respecter les règles de Remplacement et Réduction, un seul candidat vecteur sera utilisé. Ce vecteur est issu d'un projet antérieur, ou tous les candidats vecteurs ont été testés in vitro et in vivo. Dans le projet actuel, nous allons comparer l'efficacité de ce vecteur à cela de l'ERT.

129 souris adultes seront utilisées. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études et en fonction d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera léger. Afin que les principes de Raffinement soient respectés, nous utiliserons des souris jusqu'à l'âge de 6 mois, avant l'apparition des symptômes sévères. En plus, nous optimiserons l'utilisation combinée d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différents prélèvements (sang et tissus), et nous avons choisi la veine faciale comme point de collecte de sang, ce qui est moins agressif.

**8743** Les reins assurent l'élimination des déchets de l'organisme en assurant la filtration du sang. Les reins peuvent être affectés par de nombreuses maladies très différentes mais qui entraînent généralement l'apparition d'une protéinurie. A l'extrême cette protéinurie peut elle même aggraver les lésions rénales et aboutir à la destruction de l'ensemble du rein. L'infection par le VIH est une cause rare mais grave d'insuffisance rénale puisqu'elle peut conduire à la destruction complète des reins en quelques semaines. Les mécanismes responsables sont encore imparfaitement connus. Nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées. Ceci permettra de valider in vivo des cibles thérapeutiques potentielles, suggérées par les études in vitro / in silico.

En effet, l'insuffisance rénale est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, résumant l'ensemble des interactions cellulaires au sein du rein, dans un organisme vivant, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la protéinurie et la destruction rénale. La souris est un modèle de choix car son architecture et sa physiologie rénale sont proches de celles connues chez l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénèse, c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées in vitro.

Nous avons identifié une cible thérapeutique potentielle dans la néphropathie due au VIH. Cette cible peut être modulée par un traitement déjà utilisé chez l'homme dans le traitement du diabète. Nous allons tester ce traitement chez les souris en l'administrant par gavage quotidien pendant 30 jours. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de ce traitement sur les lésions rénales de notre modèle.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de maximum 1680.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions rénales. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes, permettant ainsi de prévenir ou freiner le développement de l'insuffisance rénale terminale.



**8744** La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse prédominante des neurosciences propose que l'anxiété, qui est une peur pathologique, soit causée par un dysfonctionnement des circuits neuronaux qui contrôlent la peur physiologique. Bien que de nombreuses études d'imagerie cérébrale de patients supportent cette hypothèse, elle demeure incertaine, et les mécanismes cérébraux des troubles anxieux sont toujours méconnus.

Le projet vise à définir le rôle d'une région cérébrale spécifique qui a été impliquée dans les troubles anxieux chez l'humain. Au travers d'analyses de la connectivité, de manipulations et d'enregistrements de l'activité neuronale, nous avons pour objectif de mettre en évidence les altérations des circuits du cortex insulaire dans un modèle d'anxiété chez la souris.

Ce projet a pour but de mettre en évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux contrôlant le niveau d'anxiété, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle *in vivo*.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 1728 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Avant la mise en place du modèle d'anxiété, les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou de douleur.

**8745** Les astrocytes représentent une population importante de cellules du cerveau. Leurs fonctions sont encore mal connues mais elles pourraient représenter une cible thérapeutique de choix pour moduler l'activité neuronale. Nous voulons comprendre comment les neurones et les astrocytes interagissent lors du fonctionnement cérébral. Dans cette étude nous utiliserons des agents pharmacologiques ou des approches de pharmacogénétique pour modifier le fonctionnement des neurones ou des astrocytes et nous évaluerons leurs effets sur le comportement olfactif et sur l'activité électrique du cerveau dans le système olfactif. Nous utiliserons comme modèle expérimental la souris. Nous disposons de souches de souris génétiquement modifiée de façon non dommageable, pour laquelle nous pouvons modifier sélectivement l'activité de certains neurones et des astrocytes. Notre étude implique des processus cognitifs et ne peut pas être réalisée sur des cultures de cellules. Il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocole par des modèles "in silico". Sur les 5 années du projet, nous utiliserons un maximum de 180 souris pour les enregistrements en chronique et en comportement. L'avantage des enregistrements en chronique pendant l'apprentissage est de réduire le nombre total d'animaux étudiés puisque chaque animal sera enregistré en condition contrôle et sous traitement, et ces deux conditions seront comparées sur les mêmes animaux. Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement.

**8746** Le projet est d'étudier la fonction de protéines impliquées dans des pathologies. Il s'agit de pathologies impliquant des protéines qui réalisent un transport de particules chargées (des ions) à travers les membranes cellulaires et dont la fonction est altérée, soit par des anomalies de régulation,

soit par le fait d'une mutation. Les pathologies qui découlent de ces anomalies sont très variées. Il peut s'agir de pathologies touchant un très grand nombre d'individus (comme le paludisme qui fait encore 600 000 décès par ans) ou bien un nombre plus restreint (ainsi, le cas de la mucoviscidose, la plus fréquente des pathologies génétiques rares dans la population caucasienne) ou encore très rares comme le syndrome de Dent (une anomalie du transport de chlorure au niveau du rein) ou certains retards de développement mental (par défaut du transport de créatine dans les neurones); cette liste n'est pas exhaustive.

Pour mieux comprendre les anomalies fonctionnelles qui conduisent à des pathologies, une synthèse des protéines incriminées est induite dans des œufs (ovocytes) d'un amphibien, le Xénope (*Xenopus laevis*, un crapaud à griffes aquatique) : une microinjection des ARN codant pour la protéine à étudier est réalisée dans des ovocytes préalablement prélevés chez un Xénope femelle. Cette cellule a l'avantage d'une taille très importante qui permet les études électrophysiologiques (puisque s'agit de défaut de transport d'ions, l'électrophysiologie est l'approche de choix) : la cellule a environ 1 mm de diamètre, cad 200 à 500 fois plus grande que des cellules en culture (qui ne font que quelques micromètres, une taille insuffisante pour y introduire des microélectrodes). Les ovocytes sont obtenus suite à une chirurgie abdominale de femelles adultes anesthésiées : comme de nombreuses espèces vertébrées aquatiques ou semi aquatiques (poissons ou amphibiens), les cavités abdominales des femelles sont emplies de milliers d'ovocytes (et ce, sans rythme cyclique) ; la petite incision (5mm) réalisée au scalpel est immédiatement suivie de la protrusion des œufs hors de la cavité abdominale. Ceux-ci sont alors prélevés et serviront de modèle expérimental. L'animal est ensuite réveillé en le rinçant de l'anesthésique qui a été administré par voie percutanée. Après récupération de quelques heures pendant lesquelles il est placé à l'isolement, l'animal retourne dans son aquarium avec ses congénères (de 4 à 12 individus) où il dispose de plate forme flottante et de feuillage synthétique. Un animal est susceptible quelques mois plus tard d'être à nouveau prélevé (dans la limite de 2 prélèvements de chaque côté de l'abdomen), ce qui limite le nombre d'animaux. Il est euthanasié lors de la 4ème intervention. Sur la durée du projet (5 ans), 60 animaux feront l'objet de la procédure.

**8747** Le foie est un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Chez l'homme comme chez la souris, il stocke des nutriments sous diverses formes et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il est aujourd'hui connu que le foie participe grandement à la signalisation à l'insuline et donc à la production de glucose. Lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, elle enclenche une cascade de réactions aboutissant à l'entrée de glucose dans la cellule pour sa métabolisation. Au cours du vieillissement, certaines voies métaboliques deviennent plus sensibles. Dans ce contexte, l'insulino-résistance se déclare souvent avec l'âge. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier l'impact sur le métabolisme énergétique de l'invalidation d'une des sous-unités importantes d'une enzyme participant à la cascade insulinémique. Pour cela, au cours des 5 prochaines années, nous utiliserons 3000 souris dans le but d'identifier le rôle de cette sous-unité dans l'insulino-résistance associée au vieillissement et plus généralement dans le métabolisme énergétique.

Le recours à l'animal vivant est indispensable pour tenir compte de la diversité et la complexité des voies métaboliques mises en œuvre. Nous utiliserons des souris car c'est une espèce adaptée à l'étude des mécanismes de l'insulino-résistance. Les souris utilisées seront génétiquement proches (même fonds génétique, même âge, même sexe) permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés dans un même groupe d'expérimentation. Nous gérons la reproduction de la lignée de souris et cela permet d'optimiser le nombre de souris pour chaque reproduction en fonction du nombre de souris nécessaires pour l'expérimentation future. Ce nombre de souris, qui tient compte de la reproduction des animaux et des expérimentations, est ainsi le plus réduit possible, tout en permettant l'obtention de résultats fiables statistiquement. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé et enrichi (cages avec petites cabanes en inox), et une surveillance et des soins quotidiens par du personnel qualifié. De plus, les souris ayant subi une expérience de jeûne, en vue de la réalisation d'un test de tolérance, feront l'objet d'une surveillance accrue afin de détecter et palier toute hypothermie et/ou hypoglycémie. Dans le cas d'apparition de signes de stress, souffrance ou angoisse, les souris seraient immédiatement sorties de l'expérimentation et auraient à

nouveau un accès libre à la nourriture et/ou à des soins vétérinaires adaptés. Enfin, différents tissus seront prélevés post-mortem afin de réaliser les analyses transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques liées à l'étude du métabolisme énergétique et l'insulino-résistance.

**8748** En élevage, plusieurs situations peuvent engendrer une situation de stress oxydant chez le ruminant, telles que la période de mise-bas et de début de lactation, les chocs nutritionnels (période de sevrage, restrictions nutritionnelles) ou les conditions d'élevage (chocs climatiques ou émotionnels). L'apparition du stress oxydant peut engendrer des dommages métaboliques irréversibles (mort cellulaire) entraînant des pertes de performances. Par exemple, des bovins en engraissement sélectionnés pour leur faible efficacité alimentaire présentent plus de marqueurs du stress oxydant que des animaux sélectionnés pour leur forte efficacité alimentaire.

Par conséquent, il est essentiel de développer des stratégies nutritionnelles adaptées afin de lutter contre le stress oxydant. Aujourd'hui, de nombreux produits riches en antioxydants existent sur le marché, mais il n'y a pas de consensus sur l'efficacité de ces produits pour les ruminants. Par conséquent, l'objectif de ce projet est de comparer plusieurs produits commerciaux et de sélectionner un ou plusieurs additifs ayant un potentiel antioxydant pour les ruminants.

L'efficacité de plusieurs antioxydants a déjà été testée en interne via un screening in vitro. Nous souhaitons maintenant tester in vivo les produits ayant montré les plus forts potentiels antioxydants in vitro. Nous souhaitons également tester des additifs non inclus dans l'étape de screening in vitro, car leur action ne peut être observée qu'en condition in vivo (besoin d'enzymes fonctionnelles, disponibles uniquement in vivo).

Dans ce projet, 4 lots de 10 veaux (+ 5 animaux supplémentaires au cas où un animal expérimental doit être retiré de l'essai) seront élevés selon les conditions d'élevage des veaux d'engraissement (directive 91/629/CE; ~2 semaines d'âge, ~50kg en début de projet). Les 4 lots subiront un maximum de 6 périodes expérimentales indépendantes de 3 semaines, séparées par une semaine de repos au minimum. A chaque période, un traitement alimentaire (témoin, témoin + additif A, témoin + additif B, témoin + additif C) sera attribué à chaque lot, les additifs testés étant autorisés en nutrition animale. A chaque période, les animaux subiront un stress nutritionnel (suralimentation en fer, sevrage ou suralimentation en acides gras polyinsaturés) ou émotionnel (changement de bâtiment ou mélange d'animaux) afin de provoquer un état de stress oxydant. Les 5 animaux supplémentaires recevront le traitement témoin avec induction de stress tout au long du projet.

Un prélèvement sanguin sera réalisé sur chaque animal (sauf 5 animaux supplémentaires) au début et en fin de chaque période expérimentale, afin de doser la teneur de divers composés en lien avec le stress oxydant. L'efficacité du stress appliqué sur la période sera jugée en comparant les résultats des prises de sang prélevées au démarrage et en fin de période expérimentale pour les animaux recevant le traitement témoin. A la fin de chaque période expérimentale, les animaux seront également pesés afin de juger de l'effet des traitements testés sur leurs performances de croissance. Les veaux seront logés en cases collectives afin de favoriser les échanges sociaux entre eux. De plus, les cases sont sur litière paillée, avec un paillage quotidien, assurant une litière sèche et un confort de couchage. L'état de santé des veaux sera vérifié quotidiennement par les techniciens animaliers de l'établissement utilisateur. Si l'animal présente des signes de stress, de douleur, une blessure, perte d'appétit (refus > 50% pour deux repas consécutifs) ou de poids, diarrhée ou toux, le vétérinaire sera consulté et une décision sera rapidement prise et consignée dans un cahier d'expérimentation. Les prises de sang seront réalisées par un personnel compétent et formé à l'acte ainsi qu'à la contention. Pour chaque prise de sang, le nombre de tentatives de ponction sera limité à 3 par animal afin de réduire le temps de prélèvement et la douleur engendrée par la ponction. Si au bout de la troisième tentative la prise de sang n'a toujours pas pu être réalisée, aucun échantillon de sang ne sera prélevé sur l'animal en question jusqu'à la prochaine période expérimentale.

En fin d'essai, les animaux seront réintégré dans le circuit commercial.

**8749** Le cancer du poumon correspond au cancer le plus fréquent et le plus meurtrier dans le monde. Les traitements actuels reposent sur la chirurgie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie. Cependant, les tumeurs bronchiques restent partiellement résistantes à ces deux dernières thérapies, et l'approche chirurgicale n'est envisageable que chez 35 % des patients environ. L'approche immunologique est

devenue un enjeu d'importance notamment grâce à sa capacité à atteindre des cibles spécifiques, sa faible toxicité et aux divers progrès de l'immunothérapie antitumorale. L'identification de récepteurs inhibiteurs de la réponse immune, tel que le couple PD1/PD-L1, appelé checkpoints immunologiques qui bloquent l'activation des lymphocytes T CD8, a permis de développer une immunothérapie passive à partir d'anticorps ciblant ces molécules. Ainsi, l'utilisation de ces anticorps a montré un bénéfice clinique dans le cancer bronchique et permis de prolonger la survie de certains patients, mais le taux de réponse reste limité à 20-30% des patients, dû en partie au peu de précurseurs lymphocytaires spécifique des cellules tumorales. Une autre approche d'immunothérapie consiste en l'activation du système immunitaire reposant sur l'utilisation d'antigènes spécifiques des tumeurs. C'est ainsi qu'une approche basée sur un vaccin thérapeutique vise à activer spécifiquement les lymphocytes T contre la tumeur primaire et les métastases. Malgré les résultats encourageant obtenu dans le mélanome, et de la mise sur le marché du vaccin thérapeutique Sipuleucel-T (Provenge®, Dentreon) pour le traitement du cancer de la prostate métastatique, les résultats cliniques des vaccins thérapeutiques dans le cancer du poumon demeurent encore limités, dû en partie à la faible spécificité des antigènes utilisés.

A partir de prélèvement tumoral de cancer de poumon d'un patient, notre équipe a identifié un antigène tumoral spécifique (la préprocalcitonine, ppCT) des cancers pulmonaires, permettant d'activer in vitro les lymphocytes T de patients.

L'objectif de notre étude est de développer un vaccin thérapeutique dans le cancer du poumon basé sur la ppCT en combinaison avec des anticorps (anti-PD1) pour ainsi activer des lymphocytes T spécifiques des tumeurs tout en levant l'inhibition faite par les checkpoints. Pour cela, nous utiliserons deux modèles murins humanisés, le modèle murin HHD/DR3, humanisé pour les molécules humaines de présentation HLA-A2 et DR3 (nécessaire à la présentation des peptides humain contenu dans le vaccin), et un modèle de souris immunodéficiences (n'ayant plus de système immunitaire) où nous aurons implanté une tumeur humaine de poumon. Nous reconstituerons le système immunitaire de ces souris par une greffe de PBMC humain puis nous les vaccinerons avec nos formulations vaccinales.

Pour cette étude, nous utiliserons 500 souris HHD/DR3 pour étudier l'immunogénicité de notre vaccin, l'effet des différents adjuvants, ainsi que les différentes voies d'administration du vaccin. Nous utiliserons également 1500 souris immunodéficientes humanisées par greffe pour étudier l'effet antitumoral de notre vaccin ainsi que de la combinaison de celui-ci avec d'autres immunothérapies. Les expérimentations in vivo seront réalisées toutes les 6 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenu in vivo et in vitro afin de réduire le nombre d'expériences. De plus, un maximum de conditions sera réalisé au sein d'une même expérience pour réduire le nombre d'animaux utilisés en tant que lot témoin. Enfin, les souris seront suivies quotidiennement pour vérifier leur bien être, ainsi que pour vérifier que les souris n'arrivent pas aux points limites que nous déterminerons pour chaque procédure expérimentale.

Les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental (maisons en carton et cell sizzles), et toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie locale ou générale dépendamment des gestes pratiqués.

**8750** Un antibiotique du groupe des macrolides est disponible sur le marché du médicament vétérinaire pour traiter les infections respiratoires associées aux bactéries *Pasteurella*, *Actinobacillus* et *Mycoplasma* chez les animaux de rente après administration par voie orale (bovins, porcins, volailles). Lors d'un autre projet, la possible utilisation de cet antibiotique chez les ovins en atelier d'engraissement a été testée. Les concentrations plasmatiques obtenues après une administration de l'antibiotique par voie orale chez l'agneau se sont avérées plus faibles que celles attendues et trop faibles pour que l'antibiotique ait un effet sur les bactéries responsables des infections respiratoires. Il est alors possible que ces concentrations plasmatiques plus faibles que celles attendues s'expliquent par le statut physiologique différent entre un animal ruminant (agneaux sevrés dans le projet précédent) et un animal pré-ruminant (veaux non sevrés, beaucoup plus jeunes en termes de développement que les agneaux lors de l'utilisation normale du produit). Comme nous ne disposons pas de données après administration de l'antibiotique par voie orale chez le veau pour vérifier cette hypothèse, ce projet a alors pour objectifs de :

- vérifier l'hypothèse selon laquelle les concentrations plasmatiques pour cet antibiotique varient selon le statut ruminant/pré-ruminant de l'animal,

- vérifier que les concentrations plasmatiques chez le veau sont suffisantes pour que la molécule ait un effet sur les bactéries responsables des infections respiratoires chez les animaux de rente.

Si une différence entre le statut ruminant/pré-ruminant de l'animal était détectée, cela permettrait de cibler la période pendant laquelle cet antibiotique peut être utilisé efficacement et d'éviter une utilisation inutile entraînant potentiellement une émergence de résistances à cet antibiotique dans les périodes où il serait moins efficace.

Afin de répondre à ces deux objectifs, 3 veaux seront utilisés. Le recours à l'animal est nécessaire car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études in vitro compte-tenu de la complexité des mécanismes (destruction par la flore ruminale, absorption à travers les entérocytes, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale). A l'âge de 2 semaines (statut pré-ruminant) et à l'âge de 5 semaines (statut ruminant), les 3 veaux recevront l'antibiotique par voie orale et des prises de sang seront réalisées pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la molécule. Le nombre de veau nécessaire pour mener à bien ce projet a été vérifié statistiquement.

Les veaux seront hébergés ensemble et ne seront jamais isolés pour éviter tout stress de séparation du groupe. Des brosses seront placées dans le box car elles sont appréciées par les bovins pour se gratter. Si jamais un veau a du mal à boire son lait, des tétines flottantes pourront être placés dans les seaux contenant le lait pour faciliter son alimentation.

**8751** L'adénocarcinome pancréatique (ACP) est l'un des cancers les plus graves. Avec 7000 décès par an qui lui sont imputés, il pose un problème majeur de santé publique. En dépit des importants efforts de recherche consentis au cours des dix dernières années, les traitements conventionnels n'ont qu'un impact limité. La chirurgie reste la seule stratégie potentiellement curative, mais seuls 20% des patients peuvent en bénéficier car le cancer est le plus souvent déjà très avancé ou métastasé au moment du diagnostic, la médiane de survie reste inférieure à 6 mois et la survie à 5 ans inférieurs à 3%. Pratiquement tous les patients souffrant d'un ACP développent des métastases et décèdent des conséquences dévastatrices de leur développement. Le point de départ de ce projet est la constatation que très peu de patients atteints d'ACP survivent longtemps et nous manquons de nouveaux agents thérapeutiques ciblés afin de s'attaquer spécifiquement aux cellules cancéreuses pancréatiques en épargnant autant que possible les cellules non cancéreuses dites saines. Nous faisons l'hypothèse que la comparaison de plusieurs mécanismes, et de leurs caractéristiques, dans la tumeur des patients avec une survie faible permettrait de développer des cibles thérapeutiques potentielle conduisant à une prédiction de leurs réponses aux traitements. Notre projet a pour objectif d'explorer ces caractéristiques afin de comparer les patients de courte et longue survie dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques spécifique à chaque groupe. Ce projet combinera des protocoles de recherche clinique et fondamentale dont l'objectif sera de mieux comprendre la biologie du cancer pancréatiques, pour ce faire, nous voudrions mettre en place 4 procédures,

La première ayant pour but la mise en culture directe de pièces opératoires, ce qui est essentiel car ces prélèvements contiennent un mélange de types cellulaires et quelques centaines de cellules épithéliales cancéreuses, notre technique de xénogreffe permet de diminuer la part du stroma dans les tumeurs. Cette procédure nous permettras également de mettre au point un système de congélation de tissu qui nous permet de congeler les xénogreffes et les conserver en dormance dans l'azote liquide, ce qui permet de conserver des tissus vivants pour des études futures en dehors de la souris et évite l'utilisation excessive d'animaux. Pour cette procédure nous utiliserons des souris swiss nude.

La deuxième procédure est complémentaire à la procédure 1. En effet, celle-ci est différentes au point de vue technique car ce ne sont pas des pièces opératoires mais des cyto-ponctions que nous injecterons car seul 20% des patients sont opérables, les 80% restant sont uniquement biopsiés. Les difficultés techniques de mise en culture et biologiques (mélange cellulaire) de ces prélèvements sont augmentées par rapport aux pièces opératoires car le volume du prélèvement est restreint. C'est pourquoi l'ensemble du prélèvement (en moyenne 5 milles cellules) sera implanté dans une seul

souris NOD scid pour la première injection, puis le prélèvement sera traité comme une tumeur issue d'une pièce opératoire ou une tumeur congelée (procédure 1).

Avec la troisième nous sommes dans l'optique de valider la mise au point d'un chimiogramme in vitro sur les lignées primaires établies à partir des xénogreffes, nous réaliserons les chimiogrammes sur les animaux en parallèle.

Grâce à la quatrième nous pourrions caractériser ces lignées cellulaires. En effet lors de la mise en culture des xénogreffes, nous espérons l'obtention de la lignée cellulaire correspondante, nous souhaiterions étudier le paramètre de prise tumorale en sous cutanée dans la souris immunodéficiente.

Nous estimons à 5620 le nombre d'animaux impliqués dans ce projet, cette estimation est établie en partant du principe que l'ensemble des prélèvements (pièces opératoires et cytoponctions) impliqués dans les procédures 1 et 2 seront bien collectés auprès de nos partenaires hospitaliers et que la prise tumorale de ces prélèvements sera de 100%, cette estimation est donc une estimation maximale. Notre objectif de raffinement est d'avoir une taille de tumeur n'excédant pas 0,8cm de diamètre, les animaux seront pesés avant chaque injection. Nous mettons entre 4 et 6 souris par cage (52x30x20cm) accompagné d'un enrichissement le "diamond twist", les souris sont endormies pour tous les actes qui pourraient générer de la douleur, mises sous une lampe chaude et surveillées jusqu'à leur réveil et les jours suivant l'injection, nous avons mis en place un tableau des scores afin de mieux gérer la souffrance de nos souris. Si l'état de la souris nécessite une prise d'antalgique, nous lui donnerons de la buprénorphine à 0,1mg/Kg.

**8752** De nombreuses situations mènent à une perte de muscle importante telles que l'immobilisation, un style de vie sédentaire, la microgravité ou lors certaines pathologies. Cette perte de muscle se caractérise par une perte de masse, un changement de structure et des modifications métaboliques du tissu musculaire, le tout ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Préserver la masse musculaire lors de périodes d'inactivité physique et améliorer la récupération musculaire sont donc un enjeu majeur de santé publique.

L'objectif général du programme de recherche est de développer des stratégies d'intervention pour lutter contre les pertes de protéines musculaires. Lors de l'inactivité physique, des altérations mitochondriales sont observées dans les muscles, avec pour conséquences potentielles des altérations de la production d'énergie indispensable à de nombreux processus biologiques. Ces aspects ont été très peu, voire pas caractérisés pendant les périodes de récupérations.

Nous focalisons le projet sur la mise en place de stratégies d'intervention préventives pour préserver l'homéostasie mitochondriale et la masse musculaire dans un modèle d'immobilisation de l'arrière train de souris.

Une activation à bas bruit de la réponse intégrée au stress (ISR) par l'administration d'un composé, l'halofuginone (HF), peut dans certaines situations optimiser le renouvellement des mitochondries. Notre étude consistera donc à déterminer dans quelle mesure une activation modérée et contrôlée de l'ISR par l'HF permet de prévenir les altérations musculaires et notamment mitochondriales lors de l'inactivité physique. La fonction musculaire sera évaluée par la mesure de l'activité spontanée des souris, de la masse, de l'aire et du phénotype des fibres musculaires. Ces points constitueront les points critiques pour déterminer l'efficacité des stratégies proposées. Nous évaluerons également les paramètres qui contrôlent la masse et la fonction musculaire, i.e. le métabolisme protéique musculaire, les réserves énergétiques intramusculaires, l'activité de l'ISR, les paramètres de l'homéostasie mitochondriale...

En pratique, le programme expérimental a été divisé en 4 tâches :

1) Déterminer la dose minimale efficace d'halofuginone (HF) à administrer pour induire l'ISR. L'HF est déjà largement utilisé en clinique vétérinaire pour d'autres applications et s'est avéré d'une utilisation très sûre pour les animaux.

2) Étudier l'effet de l'activation modérée et contrôlée de l'ISR sur les altérations musculaires précoces suite à la suspension. Pour cela, nous i) déterminerons la durée de suspension optimale pour observer des altérations musculaires associées à des altérations mitochondriales et ii) étudierons l'effet de l'activation modérée de l'ISR sur ces paramètres. La littérature et notre expérience indique

que 9 jours sont suffisants pour observer une perte de muscle. Notre objectif étant d'étudier des modifications précoces, nous testerons des durées de suspension inférieures ou égales à 9 jours.

3) Evaluer l'effet de l'HF sur la récupération musculaire suite à un protocole de suspension de la durée déterminée ci-dessus.

4) Déterminer si l'effet de l'HF perdure dans le temps, en testant son effet sur les altérations musculaires suite à un protocole de suspension de longue durée (3 semaines).

Nous estimons que 740 animaux seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation.

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

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel et la prise alimentaire seront donc mesurés tous les jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ( $\geq 20\%$  du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaires. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie musculaire et avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

Dans tous les protocoles expérimentaux, les animaux seront adaptés à leur environnement pendant 3 semaines. Pendant la suspension, les souris peuvent réduire leur prise alimentaire. Dans ce cas, des groupes de souris recevant la même quantité de nourriture que les souris suspendues seront inclus afin de pouvoir comparer les effets de l'immobilisation et/ou de la récupération musculaire indépendamment de modifications de la prise alimentaire.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (ouate de cellulose) pour améliorer les conditions d'hébergement.

**8753** L'insuffisance rénale aigüe (IRA) est définie par un déclin rapide de la fonction rénale. Cette insuffisance conduit à des dérèglements de la composition du sang nécessitant parfois le recours à la dialyse avec comme conséquences une maladie rénale chronique, une dépendance vis à vis de la dialyse, et une mortalité à long terme. Il est estimé que 80 à 90% des insuffisances rénales sont d'origine ischémique dont les causes cliniques sont par exemple une hypoperfusion rénale liée à un pontage coronarien, le remplacement valvulaire, les chirurgies aortiques. L'ischémie rénale est le résultat d'une privation généralisée ou localisée d'oxygène entraînant une inadéquation entre l'apport et la demande en oxygène qui va provoquer des dommages aux cellules pouvant conduire à une mort cellulaire. Il existe aujourd'hui un besoin dans le cadre du diagnostic de l'ischémie et de ces conséquences avec des approches non invasives et quantitatives.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution de l'ischémie rénale au cours du temps et d'évaluer des approches thérapeutiques par imagerie scanner classique et un nouveau type de scanner plus performant (scanner spectral). La pertinence de l'imagerie scanner avec de nouveaux agents de

contraste sera évalués. L'imagerie scanner spectral repose sur l'utilisation d'un nouveau type de scanner permettant de discriminer dans l'image les différents composants l'image.

L'imagerie sera utilisée afin de suivre l'évolution de l'ischémie et cette technique présente l'avantage d'être non invasive (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessite pas d'euthanasie d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elle permettra ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaires et s'inscrivent donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux (règle des 3Rs : R de réduire).

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux (maximum 42 par étude) sera variable en fonction du nombre de produits à tester et/ou du nombre paramètres évalués (soit 16 études) pour un total de 672 rats.

Afin de répondre à cet objectif, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable la réponse ischémique au niveau rénal. En effet, cette réponse ischémique va dépendre de très nombreux facteurs tels que la durée de l'ischémie, la présence d'un rein controlatéral, etc (R de remplacer). Le modèle, réalisé chez le rat, est un modèle largement décrit dans la littérature. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de points limites éthiques et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place (R de raffiner). Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi de mettre en place les traitements adaptés le plus rapidement possible. Lors des chirurgies, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques en cas d'infection de la zone opérée, antalgiques pour supprimer la douleur liée à la chirurgie,...)

Ce projet pourra permettre de proposer un nouvelle approche diagnostique de l'IRA.

**8754** La consommation de viande rouge est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques, rapportées par l'OMS ont été consolidées par des études expérimentales à l'aide de modèles animaux qui ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme hémérique est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur. Cette promotion du risque de cancer colorectal par le fer hémérique, est expliquée par une forte oxydation des lipides aboutissant à la formation de composés toxiques au niveau du côlon. Le type de lipide (oméga 3 ou oméga 6) présent dans la viande peut varier en fonction des conditions d'élevage du bovin et ceci peut impacter fortement la formation de ces composés toxiques au niveau du côlon après consommation. Ce projet va évaluer l'effet de différentes viandes (viande standard, viande enrichie en oméga 3, viande enrichie en oméga 3 et antioxydants) issues de conduites d'élevage bovin différentes sur le risque de cancer du côlon chez le rat après consommation des viandes. Dans le cadre de ce projet, l'objet de la présente demande est de comparer, dans un modèle animal du cancer du côlon, l'effet de trois viandes et d'un groupe contrôle sans viande sur la formation des composés toxiques au niveau du côlon et sur leur excrétion dans les urines. 52 rats Fisher F344 mâles de 5 semaines seront utilisés dans le respect du principe des 3R. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, dans un habitat contrôlé et enrichi leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Des points limites en terme de bien-être animal ont été définis et les manipulations ainsi que l'isolement des rats seront réduits au minimum évitant ainsi tout stress ou angoisse. Leur nombre sera réduit au minimum possible pour permettre néanmoins d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Il sera suivi le nombre des lésions pré-cancéreuses au niveau du côlon, ainsi que la formation des composés toxiques au niveau du côlon comme marqueurs de l'oxydation des lipides. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable, car nous travaillons avec un aliment promoteur du cancer, phénomène patho-physiologique à développement progressif lent pour lequel l'étude chez l'Homme n'est pas envisageable et de plus aucun modèle cellulaire in-vitro ne permet de modéliser le lien complexe entre aliment et cancer.



**8755** Le projet vise à améliorer chez le porcelet sevré les connaissances scientifiques sur un déséquilibre physiologique naturel bien connu chez les êtres vivants et appelé stress oxydatif ou stress oxydant. En effet, des molécules nocives et réactives appelées radicaux libres sont produites en permanence par l'organisme à partir d'oxygène. Elles ont des fonctions biologiques importantes et interviennent dans la défense contre les pathogènes. Ces composés toxiques sont habituellement neutralisés avant qu'ils n'occasionnent des dégâts par des molécules antioxydantes, comme les vitamines E et C, ou des enzymes. Mais sous l'effet d'un stress chronique, ou ponctuel comme le sevrage, de l'âge ou d'une alimentation pauvre en antioxydants, des situations de déséquilibre apparaissent entre les radicaux libres pro-oxydants et les antioxydants. Ces déséquilibres sont à l'origine d'une agression des constituants cellulaires, d'une oxydation des protéines et des lipides, et sont impliqués dans le vieillissement et dans plusieurs maladies chroniques, comme le cancer. L'objectif principal est d'étudier et valider à la fois les événements qui induisent un stress oxydatif chez le porcelet sevré et les bio-marqueurs sanguins qui reflètent le mieux ce changement du statut oxydatif. L'essai vise à fournir aux professionnels de la nutrition et de la santé des porcs un modèle expérimental permettant de tester l'efficacité de certains additifs ou matières premières spécifiques améliorant le statut oxydatif de l'animal. Cette prévention ou correction est un moyen efficace d'améliorer la santé des animaux d'élevage et de renforcer l'immunité des animaux. Elle présente ainsi un intérêt dans la perspective de réduction de l'emploi des antibiotiques en élevage. L'étude porte sur 720 porcelets répartis dans deux essais de 360 porcelets et élevés selon les pratiques agricoles usuelles. Remplacement. L'étude permettra d'obtenir des informations sur l'élevage, la santé, l'immunité des animaux grâce aux marqueurs sanguins. Les données acquises permettront de valider un modèle fiable et reproductible. Il est difficile de recourir à une autre espèce afin de mesurer l'efficacité des aliments du bétail et leurs interactions avec la santé des animaux. Il n'existe pas actuellement de modèle mathématique ou de test in vitro permettant de représenter de tels mécanismes de la santé des animaux. Réduction. Le nombre total d'animaux utilisés correspond à l'effectif nécessaire pour mesurer dans les conditions habituelles d'élevage les effets sur la consommation d'aliment et la croissance individuelle grâce à des pesées. Parmi eux, des prélèvements sanguins pour le dosage de plusieurs biomarqueurs sont effectués sur un nombre plus réduit d'animaux soit 96 porcs sur 720 au total. Raffinement. Le savoir-faire et l'expérience du personnel en matière d'élevage porcin et de procédures expérimentales garantissent l'absence de douleur animale et de détresse, et la prise en charge optimale du bien-être. Les animaux sont élevés en conditions optimales garantissant un bon état sanitaire. Les protocoles appliqués (vaccination et brève élévation de la température) permettent de mesurer le stress oxydant dans le plasma sans souffrance pour l'animal. Le protocole réduit le nombre de manipulations. Ainsi, les animaux ne seront manipulés que toutes les deux semaines sur une durée de six semaines et uniquement deux animaux par case seront prélevés lors des prises de sang pour l'analyse des bio-marqueurs sanguins. Les porcs sont élevés jusqu'au terme de la durée habituelle d'élevage en France.

**8756** L'imprégnation sexuelle est le processus par lequel la préférence sexuelle d'un individu est influencée par l'apprentissage, à un très jeune âge, du signal de reconnaissance porté notamment par l'un des parents. Il s'agit d'un processus très répandu dans le monde animal et pouvant jouer un rôle important dans la diversification des espèces. Chez la souris domestique, le choix du partenaire sexuel repose au moins partiellement sur un système de reconnaissance de type olfactif, i.e. impliquant des signaux odorants et des récepteurs olfactifs. Nous nous intéressons ici au rôle de l'apprentissage sur la divergence des préférences sexuelles entre les deux sous-espèces européennes de la souris domestique. En effet, des travaux précédents ont mis en évidence la mise en place d'un processus d'isolement reproductif entre ces deux sous-espèces dans les régions d'Europe où elles forment des contacts et peuvent s'hybrider (ex : au Danemark). Le processus d'isolement reproductif se traduit par une divergence de leurs signaux de reconnaissance sexuelle ainsi que de leurs préférences, entraînant un choix du partenaire assortatif qui pourrait les emmener à une spéciation complète (rupture de flux de gènes entre les deux

génomés). Dans le contexte de nos recherches menés sur les mécanismes à l'origine de la diversification des espèces, nous cherchons à comprendre quel est le rôle de la transmission culturelle dans la divergence des préférences sexuelles de ces deux sous-espèces.

Des nombreuses études existent sur l'apprentissage olfactif chez la souris et les corrélats neurophysiologiques de cet apprentissage. On sait par exemple que la manipulation de l'environnement olfactif de nouveaux nés peut entraîner des changements de leurs préférences olfactives à l'âge adulte, ainsi que des modifications de l'expression des gènes de récepteurs olfactifs potentiellement impliqués dans ces mécanismes de reconnaissance, suggérant ainsi l'importance de l'imprégnation olfactive postnatale dans l'expression des préférences sexuelles.

Ce projet propose de manipuler l'expérience olfactive des souris : 1) en les soumettant à des odeurs différentes, ou 2) si la reproduction est synchronisée en réalisant des adoptions croisées de portées des souris des deux sous espèces au jour 1 de leur naissance. En deuxième temps, la préférence olfactive des souris sera testée. Notre protocole expérimental implique quatre conditions : 2 'contrôles' : les odeurs présentées seront de même origine que les souris testées ou les adoptions croisées impliqueront des souris de la même sous espèce (10 réplicas pour chacune des deux sous espèces); 2 'tests' : les odeurs présentées seront d'origine différente que les souris testées ou les adoptions croisées impliqueront des souris de sous espèces différentes (10 réplicas pour chaque sens d'adoption, ou d'application d'odeurs). Au total 40 portées seront concernées par cette expérience (donc 160 à 240 souris suivant la taille de chaque portée).

Nous sommes particulièrement soucieux du bien-être des souris de nos élevages : elles sont maintenues dans des cages enrichies en objets leur permettant de se cacher et de se mouvoir notamment sur des tourniquets. Les souris sont maintenues dans un environnement social "serein" : les couples ou membres du groupe sont séparés si signe de stress. Nous avons réduit le nombre de réplicas à tester au minimum nécessaire pour l'interprétation des résultats. En effet, sont impliqués dans nos expériences les descendants de 10 couples par catégorie. Nous utiliserons tous les membres de chacune des portées dans la procédure visant l'imprégnation olfactive, pour éviter de stresser les fratries en les séparant. Le nombre de souris utilisées dans la procédure : test de préférence olfactive (réalisé à l'âge de 5 semaines) sera ajusté en fonction de la variabilité des réponses. A ce jour le remplacement du modèle animal pour ce type d'étude n'est pas envisageable.

**8757** Parmi les nombreux facteurs susceptibles d'influencer le développement d'un individu, les parents, et en particulier la mère, jouent un rôle prépondérant de par leur influence à la fois génétique et non génétique sur leur progéniture. En effet, au stade prénatal, l'embryon se développe soit au sein de l'organisme maternel soit dans une structure produite par la mère, l'œuf. Après la naissance ou l'éclosion, nombre de jeunes mammifères et oiseaux dépendent de leur mère pour s'alimenter et se réchauffer. Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence les influences maternelles pré- et postnatales sur la réactivité émotionnelle, la motivation sociale, les rythmes biologiques ou encore le développement vocal des jeunes.

Chez certaines espèces d'oiseaux capables d'apprentissage vocal parmi lesquelles celles appartenant au sous-ordre des Oscines, la structure des vocalisations des jeunes peut être influencée par des individus conspécifiques, souvent les parents. Chez les Galliformes, oiseaux non-Oscines, il est généralement admis que le développement vocal n'est pas influencé par l'environnement social. Dans cette étude nous souhaitons explorer le rôle des influences maternelles pré- et postnatales sur le développement vocal des jeunes chez un Galliforme, la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*). Pour ce faire, nous allons réaliser une stimulation auditive avec des roucoulements maternels au cours des derniers jours d'incubation, puis une méthode de privation maternelle sera utilisée afin de comparer le développement vocal des cailleteaux maternés et non maternés. Nous utiliserons 24 femelles et 88 cailleteaux afin de former 24 groupes de 2 cailleteaux maternés et 20 groupes de 2 cailleteaux non maternés. Certaines mères pouvant exprimer des comportements de rejets envers les cailleteaux, nous prévoyons des effectifs plus importants pour les lots maternés.

Les vocalisations des cailleteaux seront enregistrées dans deux contextes : isolement social et réunion par exposition à un miroir. Des tests comportementaux permettront également d'évaluer le niveau d'émotivité des cailles.

Ce projet respecte la règle des 3R.

- Remplacement : l'étude repose sur l'observation comportementale des animaux et l'enregistrement de leurs vocalisations, aussi nous ne pouvons pas nous soustraire à l'utilisation d'animaux vivants.
- Réduction : nous estimons que le nombre d'animaux choisis est le minimum requis pour obtenir une puissance statistique suffisante et tenir compte de la variabilité interindividuelle.
- Raffinement : Aucune pratique invasive n'est requise dans le cadre du projet et un suivi journalier permettra de veiller au bon état de santé des animaux tout au long de l'expérimentation.

**8758** L'objectif de notre projet est d'évaluer l'impact d'une exposition alimentaire à un mélange de perturbateurs endocriniens (pesticides) à des faibles doses sur l'homéostasie métabolique et le système nerveux central. Nous avons choisi en effet un cocktail de 6 pesticides utilisés dans le traitement des pommeraies en Occitanie et fréquemment retrouvés sur les pommes consommées. Dans notre projet nous nous proposons d'utiliser un modèle animal mimant l'exposition des consommateurs, pendant les périodes de vulnérabilité périnatale et à l'âge adulte. Les animaux recevront dans leur ration alimentaire l'équivalent pour chaque pesticide de la dose journalière admissible. La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) est supposée limiter l'entrée de pesticides dans le cerveau, à l'exception d'intoxications aiguës qui sont à l'origine de symptômes neurologiques aigus. Cependant, aucune étude n'existe sur les effets de l'exposition à long terme de la barrière hémato-encéphalique à des mélanges de pesticides à faibles doses. Ces modifications pourraient être dépendantes de fenêtres critiques d'exposition, telles que la gestation et la lactation qui sont des périodes de mise en place des structures neurovasculaires. Nous émettons l'hypothèse que l'exposition des mères à ce mélange pesticides induit dans la descendance des perturbations métaboliques qui seraient responsables de la modification de perméabilité de la BHE, phénomène impactant en retour l'activité neuronale. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le mécanisme de neurotoxicité environnementale. Nous évaluerons également l'effet de ces expositions sur l'apparition de troubles du comportement et le retard de développement cognitif. Ces résultats seront complétés par les mêmes études chez l'adulte.

Notre projet permettra d'apporter des éléments concrets disponibles pour les agences d'évaluation du risque et les décideurs en vue de l'estimation du risque pour la santé que pose l'omniprésence des pesticides dans notre alimentation.

En pratique, l'étude se compose de 2 parties : pour la phase d'exposition périnatale : nous avons besoin de 144 souris pour une analyse de 24 semaines. Pour la phase adulte, 320 souris suivies pendant un an à partir du sevrage.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

**Remplacer** : Si des expérimentations de toxicité aiguë des pesticides peuvent se faire sur cultures de tissus, nous abordons les pesticides à faibles doses sous l'aspect de perturbateurs endocriniens, il nous faut faire appel à un modèle intégré de mammifère, la souris est la plus adaptée à notre étude, elle se reproduit relativement facilement en captivité, la période de gestation est courte, les petits sevrés en 3 semaines.

**Réduire** : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Nous préleverons le maximum d'organes et de fluides, conservés de manière à pouvoir effectuer des études avec un large panel de techniques. Des expérimentations antérieures ayant déterminé la dose de pesticide adéquat, en conséquence, il ne sera pas fait appel à des doses-réponses, réduisant l'étude à une seule cohorte. Les quatre tests de comportement sont non invasifs, ils pourront donc être effectués sur la même cohorte. Des animaux des groupes contrôles (par exemple les pères et mères gestantes) seront réintégrés sur d'autres protocoles dans le laboratoire, reproduction ou autre.

**Raffiner** : des expériences préliminaires ne montrent pas d'effet incommode de la prise de ces pesticides à faibles doses, plutôt l'induction de modifications métaboliques subtiles aboutissant à une légère prise de poids. Nous veillerons à respecter le bien-être animal par la mise en présence de plusieurs individus par cage lorsque c'est possible et la pose d'enrichissement dans les cages : copeaux de cellulose, « maison en carton », bâtonnets de ouate... Nous veillerons à l'observation quotidienne des animaux avec application des points limites en cas de souffrance. Concernant les animaux subissant une intervention chirurgicale, une anesthésie sera pratiquée pour inhiber toute forme de douleur pendant toute la durée de la chirurgie. Avant le démarrage et pendant l'acte chirurgical, la profondeur de l'anesthésie sera évaluée par test du réflex à la pression des doigts d'un

membre postérieur afin de s'assurer de l'absence de réactivité. L'opération et le réveil s'effectueront sous maintien en température (couverture de survie, lampe infrarouge). Un analgésique sera administré via l'eau des biberons pour éviter une éventuelle douleur liée à la cicatrisation. Si des animaux montraient d'éventuels signes d'infection, ils seraient traités par antibiotiques sur la plaie et/ou par voie orale.

**8759** Les lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire essentielles pour combattre les infections et permettre au corps de garder en mémoire les infections passées. Ils reconnaissent des morceaux de pathogènes (bactéries ou virus) sur le modèle « clé/serrure » : chaque lymphocyte T (« clé ») reconnaît un morceau particulier d'un pathogène (« serrure »). Théoriquement, nous avons dans le corps des centaines de millions de lymphocytes T afin de couvrir la reconnaissance de n'importe quel pathogène (et donc chaque lymphocyte T est unique ou presque). Certaines populations de lymphocytes T échappent à cette définition et reconnaissent des composés partagés par différentes bactéries. C'est le cas des cellules MAIT (Mucosal associated invariant T cells) ou cellules T invariantes associées aux muqueuses, qui reconnaissent des caractères communs à beaucoup de bactéries différentes. Ces cellules sont présentes en grande quantité chez l'homme (1 et 10% de la totalité des lymphocytes T du sang), et sont particulièrement présentes au sein des tissus tels que le foie, le poumon, l'intestin notamment. De plus, elles ont des caractéristiques spécifiques qui leur permettent de répondre très rapidement à une infection, plus rapidement qu'un lymphocyte T classique. Ces données suggèrent donc qu'elles pourraient avoir un rôle de défense contre les microbes.

Les lymphocytes T « classiques » circulent en permanence dans le corps, augmentant ainsi les chances d'être présents lorsqu'une infection a lieu. Des données récentes démontrent que ce n'est pas le cas pour les cellules MAIT, qui restent au sein du tissu dans lequel elles se sont établies. Des analyses complémentaires suggèrent que les cellules MAIT aient acquis des propriétés particulières liées à l'organe qu'elles peuplent. Ainsi, dans le poumon, elles semblent avoir des fonctions leur permettant d'améliorer la réparation tissulaire.

Nous avons généré un modèle génétiquement modifié, qui ne dispose pas de ces cellules et nous souhaitons tester cette hypothèse par l'utilisation d'un modèle de lésion pulmonaire.

Le modèle animal retenu consiste en une lésion induite par l'administration d'élastase (de porc majoritairement). Les élastases lysent l'élastine, composant majeur responsable de l'élasticité des poumons. Les élastases vont dégrader cette élastine au niveau alvéolaire majoritairement provoquant la déstructuration du tissu alvéolaire.

Des souris porteuses ou non de ces cellules MAIT seront traitées, afin de savoir si la présence de ces cellules protège contre le développement de cet emphysème.

Nous prévoyons d'utiliser 24 animaux au total dans ce projet, 12 animaux disposant des cellules MAIT seront comparés à 12 animaux sans ces cellules. Parmi ces 12 animaux, 8 recevront de l'élastase et 4 n'en recevront pas.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous ne pouvons utiliser autre chose qu'un modèle animal, car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de l'emphysème. De plus, la souris est déjà utilisée et bien étudiée dans l'emphysème. Le modèle de souris présentera des symptômes similaires aux patients humains atteints d'emphysème, ce qui permettra de caractériser de manière pertinente le rôle potentiel des MAIT dans le tissu pulmonaire.

Raffinement :

Le modèle utilisé ici n'engendre pas de douleur particulière. En cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance. Enfin, 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.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé par une analyse statistique pour obtenir des résultats exploitables. De plus, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par l'administration d'élastase. Ainsi, 24 souris seront utilisées pendant ce projet.

**8760** Les maladies génétiques et/ou auto-immunes présentent aujourd'hui un grand enjeu de recherche translationnelle et demeurent malgré tout encore difficiles à traiter avec succès. La thérapie cellulaire est une des pistes prometteuses, puisqu'elle pourrait permettre à terme de régénérer ou de remplacer les tissus lésés par du tissu sain. De nombreuses pathologies sont aujourd'hui traitées par des anticorps modifiés et doivent être administrés par voie intra-veineuse, le plus souvent quotidiennement. Cela nécessite des injections répétées et contraignantes d'une part et implique des variations en dents de scie du traitement.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une preuve de concept que des cellules souches génétiquement modifiées en cellules musculaires sont capables de générer une protéine thérapeutique dans la circulation sanguine à des concentrations suffisantes pour une application clinique. Les cellules générées seront greffées dans un modèle murin porteur de lésions musculaires. Cela permettrait d'aboutir à une thérapie cellulaire où la cellule, outre sa capacité régénératrice serait également capable de relarguer dans la circulation son propre médicament sans intervention supplémentaire.

Les avancées de ce plan de recherche pourraient déboucher sur la mise en place de techniques de thérapie cellulaire humaine, où des cellules greffées parviennent d'une part à régénérer des muscles lésés dans des maladies musculaires.

D'autre part, leur capacité à libérer des protéines thérapeutiques permettrait de combattre des maladies dégénératives en libérant l'agent thérapeutique directement dans la circulation sanguine.

Deux expérimentations impliquant respectivement 20 et 45 souris sont planifiées dans ce projet, soit un effectif total de 65 animaux.

Les expérimentations débutent par une injection intra-musculaire d'une toxine induisant une lésion chimique du muscle tibial antérieur d'une des deux pattes postérieure des animaux.

Cette opération est maîtrisée et n'entraîne pas d'effet secondaire, hormis la lésion réversible entraînant une inflammation localisée.

Des cellules musculaires génétiquement modifiées sont ensuite greffées par injection dans le muscle afin de réparer la lésion. Il est donc attendu une régénération de la lésion et un meilleur état de santé de la souris. Par ailleurs, les cellules greffées sont modifiées préalablement de manière à générer une protéine thérapeutique dont les effets sont présumés être bénéfiques pour l'animal.

Nous souhaitons donc étudier la régénération de la lésion ainsi que la libération de cette protéine à but thérapeutique.

1- Remplacement : Les effets biologiques recherchés ne permettent pas de remplacer le modèle animal par un autre modèle in silico ou in vitro. En effet, dans ces expériences, l'effet recherché est une sécrétion de protéines recombinantes par les cellules greffées dans l'animal et ayant une visée thérapeutique. La variable de libération de la protéine dans le système circulatoire ne peut à l'heure actuelle pas être mimée par un autre modèle non-animal.

2- Réduction : Chacun des groupes constituant l'étude a été établi avec un minimum de souris afin d'obtenir un échantillonnage permettant d'obtenir une puissance statistiquement significative. Cette estimation du total de souris est quant à elle basée sur l'historique du savoir-faire des expérimentateurs connaissant les risques de perte d'animaux liés aux manipulations.

3- Raffinement : La souris (*Mus musculus*) a l'avantage de compter de nombreuses lignées mutantes, notamment ici une lignée immunodéficiente (*Rag2/γc*) afin de d'optimiser les chances de prise de greffe des cellules.

La lésion passagère et réversible du muscle tibial antérieur des souris sera observée attentivement durant les étapes précoces du protocole. De plus, greffe de cellules a entre autres pour visée la régénération du muscle. Nous n'anticipons en revanche aucun effet délétère lié à la sécrétion de la protéine recombinante thérapeutique.

Cependant, tout animal présentant des signes de mal-être fera l'objet d'un suivi particulier avec application le cas échéant de points limites évitant toute souffrance non acceptable.

En termes d'amélioration du confort durant les différentes étapes du projet, les yeux sont protégés par un hydrogel le temps de l'anesthésie gazeuse, les plans cutanés et musculaires du champ opératoire sont préservés du dessèchement par rajout de sérum de Ringer. Un anesthésie ainsi qu'un analgésique sont prévus pour prendre en charge toute douleur potentielle.

**8761** L'acide valproïque est un médicament anti-convulsion utilisé pour le traitement des épilepsies. Ce médicament présente un risque important lorsque qu'il est pris au cours de la grossesse : l'acide valproïque est responsable de malformations chez les fœtus de femmes enceintes comme la non-fermeture du crâne mais aussi à des retards mentaux.

Notre équipe étudie comment se mettent en place ces défauts lors de la prise d'acide valproïque. Plus précisément, nous voulons voir si les voies de régulation impliquées sont liées à la sénescence. La sénescence est le processus de vieillissement biologique. Nous voulons analyser si en présence d'acide valproïque nous observons un niveau plus élevé de sénescence. La sénescence se montre par un arrêt de division des cellules : ceci pourrait être lié à la non fermeture du crane ou au retard mental. Pour répondre à ces questions, nous allons apporter un excès d'acide valproïque en début de gestation chez la souris. Il a été publié qu'une dose de 300mg/kg d'acide valproïque donné 3 fois par jour peut induire le phénotype neural et ne présente aucun phénotype dommageable chez la mère gestante.

Nous aurons besoin de 2780 animaux au total, respectant les règles 3R :

i) Réduction : les protocoles sont bien établis, cela nous permettra de minimiser le nombre de souris nécessaires.

ii) Raffinement : nous limitons l'analyse à une dose 300mg/kg qui est suffisante pour produire le phénotype. Cette dose ne produit pas de phénotype dommageable chez la mère gestante.

iii) Remplacement : Comme ce projet étudie un problème de gestation, la souris est le modèle le plus rapide et le plus proche de l'homme.

De plus, le développement du tube neural est très bien caractérisé chez la souris, ce qui nous permet d'analyser les effets de molécules chimiques (médicament) et de les comparer aux problèmes qu'ils entraînent chez l'homme ainsi que de trouver les gènes qui sont mal régulés.

**8762** Le poisson zèbre est très utilisé dans les études portant sur la régénération, c'est à dire la capacité d'un organisme à réparer un tissu abimé. Au contraire des mammifères il présente un potentiel exceptionnel de régénération suite à des lésions sur le cœur ou le cerveau. Plusieurs équipes ont montré que le cerveau antérieur, la moelle épinière ou la rétine du poisson zèbre régénèrent de nouveaux neurones après une lésion mécanique. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ces capacités pourrait ouvrir de nombreuses perspectives pour le traitement de maladies ou traumatismes qui touchent le cerveau. Un des points clé est d'identifier les cellules à l'origine de la génération des nouveaux neurones.

Notre projet vise à décrire quelles cellules sont activées par une lésion du cerveau et donnent naissance aux neurones qui répareront le cerveau endommagé chez le poisson zèbre. Dans ce but, nous étudierons une région du cerveau qui se nomme le toit optique. Le toit optique présente en effet plusieurs avantages :

1) cette région du cerveau traite les informations visuelles et est située en position dorsale, elle est donc facile d'accès pour faire une lésion qui n'aura que peu de conséquences sur le comportement du poisson;

2) il est formé de deux lobes symétriques. Nous n'effectuerons la lésion que dans un lobe, l'autre nous servant de contrôle pour nos analyses.

Nous effectuerons une lésion dans le toit optique au moyen d'une fine aiguille insérée à travers le crâne sur des adultes préalablement anesthésiés. Les lésions du système nerveux n'induisent pas de douleurs car le cerveau ne contient pas ce type de cellules sensorielles et la blessure superficielle de la peau et du crâne se répare en quelques jours. Nous réaliserons cette procédure sur des poissons sauvages afin de décrire la dynamique d'activation des cellules (à quel moment et pendant combien de temps ils s'activent) puis sur des poissons génétiquement modifiés qui nous permettront de marquer la descendance des cellules activées par la lésion pour montrer qu'elles donnent des nouveaux neurones.

Ce projet fait intervenir 5 procédures toutes classées en sévérité légère et nécessitera un maximum de 776 poissons.

Nous avons mis en place des mesures pour répondre aux exigences des 3R :

- remplacement : nous travaillons sur des mécanismes à l'œuvre chez un animal vivant, le remplacement n'est donc par définition pas possible.

- réduction : notre méthode de lésion sur une structure symétrique du cerveau permet que l'animal traité serve lui-même de contrôle. Nous divisons ainsi par deux le nombre d'animaux que nous aurions dû utiliser si nos animaux contrôles étaient des animaux non soumis à la lésion. Nous limitons le nombre d'animaux au strict minimum nécessaire à nos analyses statistiques.

- raffinement : toutes nos procédures sont établies avec l'objectif de minimiser les chocs de température et les chocs osmotiques auxquels les poissons sont particulièrement sensibles. Toutes nos procédures sont effectuées sur des poissons anesthésiés lorsque cela est nécessaire. Nous prévoyons des points limites spécifiques pour certaines procédures.

**8763** Le rein contrôle la composition hydroélectrolytique de l'organisme en adaptant l'excrétion dans l'urine des ions, de l'eau et des déchets. Cette fonction est rendue possible grâce à un grand degré de complexité phénotypique et de spécialisation fonctionnelle des cellules épithéliales rénales. En particulier, le canal collecteur, situé dans la partie finale du néphron, joue un rôle crucial dans la régulation fine de l'homéostasie est caractérisé par un épithélium hétérogène. On distingue ainsi les cellules principales qui assurent le transport de l'eau, du sodium et du potassium, les cellules intercalaires A qui secrètent de l'acide et absorbe des bases, et les cellules intercalaires B qui secrètent des bases, absorbent de l'acide et participe également à la réabsorption de chlorure de sodium. Ces cellules intercalaires jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Pour étudier la formation de ces cellules et leur différenciation, il n'existe aucun modèle cellulaire. Un modèle animal pour l'étude d'un système intégré comme le fonctionnement du rein est donc nécessaire. De plus pour comprendre la régulation qui s'exerce dans ces cellules lors de l'adaptation à différentes conditions environnementales (charge en sel, charge acide et en base, charge en chlorure de lithium), seul un modèle animal peut répondre à ces questions. Un nouveau modèle de marquage fluorescent des cellules B chez la souris a été généré.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement des cellules intercalaires lors de l'adaptation à différentes conditions environnementales. Nous estimons que 48 souris seront nécessaires pour répondre à notre objectif.

Le nombre de souris nécessaire a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation des résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

**8764** La présente étude est importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des maladies avec dégradation de la barrière vasculaire de la rétine (BRB). Notre modèle d'étude est une souris transgénique n'exprimant pas la dystrophine Dp71, une protéine responsable d'altérations du système nerveux dans la myopathie de Duchenne. Cette protéine exprimée dans les cellules gliales de la rétine participe à la fonction de la BRB et une meilleure compréhension de son rôle peut avoir un impact pour plusieurs autres pathologies rétinienne. De plus, il existe une approche de thérapie génique permettant de ré-exprimer cette protéine et notre projet a pour but de tester son efficacité à restaurer un fonctionnement normal de la rétine, ce que nous évaluerons à l'aide d'électrorétinogrammes (ERG). Les ERG seront effectués avant et après traitement sur des souris déficientes en Dp71 et leurs frères sains. L'étude portera sur 36 souris (8 transgéniques traitées avec un vecteur AAV ré-exprimant la Dp71 et 8 injectées avec un vecteur contrôle, et 8 souris saines).

L'ERG est une méthode non invasive, indolore et rapide (lentilles de contact) mais les animaux seront sous anesthésie générale pour les immobiliser sur une plateforme chauffée pour maintenir la température corporelle), sous analgésique pour leur éviter toute gêne induite par les lentilles sur la cornée, et des injections locale (collyre) et générale (solution saline) éviteront la déshydratation oculaire. Lors des injections intraoculaires du traitement, nous ajouterons à ce protocole une injection locale (collyre) et générale (sous-cutanée) d'antalgique, qui sera prolongée 48h en post-opératoire. Les animaux resteront sous surveillance pendant la période post-opératoire et tout signe de souffrance/inconfort (quantifié à l'aide d'une grille d'évaluation) conduira à une intervention corrective en accord avec notre vétérinaire référent. Les conditions d'hébergement des animaux sont standards, avec un cycle normal de lumière / obscurité de 12 heures et de l'eau et de la nourriture disponible ad libitum.

**8765** La demande d'autorisation concerne une séance de travaux pratiques d'éthologie dispensée à des étudiants de Master. L'expérience consiste à étudier les effets d'une période d'isolement social dans le jeune âge sur l'expression des comportements sociaux chez la souris.

Cette expérience sera réalisée sur des jeunes souris, mâles et femelles, de la souche Swiss. Au total, 160 souris seront utilisées dans ce projet. A la naissance, les souris sont laissées avec les autres jeunes de la portée et leur mère dans une cage standard d'élevage. Suite au sevrage (séparation maternelle réalisée à 3-4 semaines), les jeunes souris seront soit maintenues en groupe social (groupe de 5 individus de même âge et de même sexe), soit placées dans une cage individuelle pendant une durée de 7 semaines. Lors de la séance de TP, les étudiants regroupés en trinôme (8 trinômes d'étudiants par année universitaire) réaliseront les rencontres suivantes : 1) entre deux femelles élevées dans deux groupes différents ; 2) entre deux femelles élevées dans le même groupe ; 3) entre une femelle et un mâle élevés dans deux groupes différents ; 4) entre deux femelles élevées en isolement ; et 5) entre une femelle et un mâle élevés en isolement. Chaque année, nous aurons pour cette séance 8 trinômes d'étudiants. Autrement dit, seulement 8 souris mâles (1 mâle x 8 trinômes) et 24 souris femelles (3 femelles x 8 trinômes) seront concernés par une période d'isolement social par année universitaire. Chaque rencontre réalisée dans un open-field durera 30 minutes, pendant lesquelles les étudiants noteront de manière standardisée le comportement des deux souris et leurs relations spatiales. Les résultats collectés permettront aux étudiants de mieux comprendre l'importance de la vie sociale, plus particulièrement dans le jeune âge, chez les espèces sociales.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R. Remplacer : ces travaux pratiques permettent justement aux étudiants d'apprendre à manipuler du vivant (techniques de manipulation délicate des souris) et de mesurer l'importance d'un design d'expérimentation animale puisqu'ils partent d'un animal vivant. Réduire : le nombre de souris en réalisant le protocole sur le nombre d'animaux strictement nécessaire pour réaliser cette séance de TP. Raffiner : l'isolement social ne durera que 7 semaines, durée minimale garantissant l'effet recherché (à savoir une plus grande proximité spatiale et plus d'agressions lors de la rencontre de deux individus élevés en isolement social) et sa quantification, sans pour autant que cette durée ne provoque de troubles comportementaux durables. Lors des périodes d'isolement, nous apporterons aux animaux des éléments d'enrichissement pour leur permettre d'exprimer des comportements d'exploration.

**8766** 1-Objectif scientifique du projet :

Les Henipavirus sont des virus zoonotiques (passant de l'animal à l'homme), qui ont émergé en Australie puis en Asie du Sud-Est pendant les années 90. Ce nouveau genre est composé de deux virus appelés respectivement Hendra (HeV) et Nipah (NiV). Le virus Hendra est apparu le premier et cause des ravages dans les troupeaux de chevaux australiens. En 1998, en Malaisie, NiV a émergé, via les chauves-souris, chez les porcs avant de passer à l'homme provoquant l'infection de 265 personnes, avec 40% de mortalité. Pour enrayer cette épidémie plus d'un million de porcs furent euthanasiés. Cette infection représente une des zoonoses virales parmi les plus dangereuses transmises par les chauves-souris, posant des problèmes médicaux et économiques sérieux. Depuis, 15 réémergences se sont succédées en Indes et au Bangladesh avec plus de 80% de mortalité humaine et une transmission interhumaine reconnue dans un tiers de cas. La souche NiV Bangladesh présentant au-delà de sa variabilité génétique (92% d'identité nucléotidique avec la souche Malaisienne) des caractéristiques qui lui sont propres telles qu'une plus grande propension à cibler le système pulmonaire, ou encore la capacité à se transmettre d'homme à homme, qui n'a pas été observé avec la souche NiV Malaisie. Plus récemment, la découverte de l'exposition d'une forte proportion des porcs du Ghana au NiV, a attiré une attention particulière de l'OIE et l'OMS concernant le danger grandissant encouru si rien n'est entrepris pour lutter contre les zoonoses à Henipavirus. De plus, l'absence de traitement et de vaccin efficaces commercialisés ainsi que la forte mortalité qu'ils engendrent, font de ces virus un réel danger pour l'homme et de potentiels agents de bioterrorisme. A ce jour il n'existe qu'une publication sur l'infection des vervets avec le virus Nipah Bangladesh, démontrant les différences importantes avec la souche NiV-Malaisie, utilisée précédemment. Cependant, les différents aspects immunologiques pouvant expliquer ces différences



restent à comprendre afin de permettre de développer des approches préventives et thérapeutiques adéquates.

L'objectif de ce projet, qui s'étendra sur maximum 2 ans, est de constituer une base de connaissances immunovirologiques sur le virus Nipah, souche Bangladesh, qui permettront par la suite d'enchaîner sur un projet ayant pour but de contribuer à la mise en place d'une nouvelle stratégie antivirale contre les Henipavirus. Les connaissances à acquérir concernent la cinétique de propagation du virus chez le vervet en fonction de dose virale suite à l'infection endotrachéale et le suivi de la virémie et différents facteurs immunologiques et biochimique dans le sang mais également l'étude de la pathologie en fonction de la dose de virus en observant la mortalité (nombre d'animaux atteignant les points limites et mis à mort) et l'immunohistochimie des organes atteints. Il apportera ainsi des réponses en recherche fondamentale.

2- Retombées attendues :

Ce projet présente une première étape d'étude d'immunopathogenèse de l'infection par le virus Nipah, souche Bangladesh et devrait constituer une base pour les études consécutives qui ont pour but de valider l'efficacité d'un traitement contre l'infection par le virus Nipah. De plus, la dose létale (DL50) avec la souche de NiV Bangladesh n'est pas été testé pour instant et ces informations n'existent pas non plus dans aucune publication disponible. De ce fait, il apparait indispensable de pouvoir au moins approximer la DL50 de ce nouveau virus en parallèle de l'étude de sa pathogenèse qui pourrait varier en fonction de la dose virale utiliser. Ainsi, nous pourrons établir de nouvelles bases essentielles à la mise en place de dose de référence pour tester de nouveaux traitements antiviraux potentiels.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Toutes les étapes du projet scientifique global sont basées sur des études effectuées et validées auparavant par une méthode in vitro, ex vivo et in vivo chez le hamster. La poursuite des tests chez le Primate Non Humain (PNH) plus précisément le Vervet est nécessaire afin de procéder à l'essai clinique chez l'homme. Afin d'assurer le suivi de la température en continue (toutes les 15 minutes) et sans contention, les animaux subiront une petite chirurgie chez le fournisseur pour l'implantation d'une gélule en intrapéritonéale. L'état de l'animal sera évalué grâce à une grille de scoring et des points limites précis sont décrits. Toute atteinte de ces points limites entrainera l'euthanasie immédiate de l'animal. L'ensemble des gestes techniques seront réalisés sous anesthésie. Les animaux seront infectés par voie endo-trachéale (pour simuler l'infection chez l'homme) avec le virus Nipah souche Bangladesh. Il est à noter que pour des raisons de sécurité biologique, le virus est administré directement dans la trachée à l'entrée des poumons plutôt que par la nébulisation dont on ne maîtrise pas la dissémination du produit. Les animaux seront anesthésiés 3 fois par semaine pour un examen clinique avec prélèvements de sang. Les animaux qui seront malades présenteront des signes d'asthénie, des troubles respiratoires, voir des troubles neurologiques. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de la procédure.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Ce projet nécessitera l'implication de 10 vervets répartis sur une procédure jugée sévère. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum afin d'observer les effets attendus.

**8767** La rétine, l'organe neurosensoriel de l'œil, est soumise à différents stress et facteurs environnementaux qui peuvent conduire à son altération. Paradoxalement, la lumière est un de ces facteurs. Depuis peu, l'apparition de l'éclairage par LED (diode électroluminescente) relance le problème de la toxicité rétinienne de la lumière. Ces dispositifs présentent une forte luminance et un spectre d'émission particulier avec un déséquilibre spectral vers les faibles longueurs d'onde (lumière bleue).

Les directives européennes nous incitent à remplacer les lampes incandescentes par des ampoules LED. Ceci est pleinement justifié du point de vue énergétique. Pourtant des études montrent une toxicité rétinienne accrue des LED par rapport à d'autres formes d'éclairage telles que les lampes à incandescence ou les fluocompactes, toxicité due à leur richesse en lumière bleue.

Chez l'Homme, la lumière bleue pourrait provoquer une maculopathie (altération de la macula, la zone de vision distincte de la rétine) surtout chez le jeune, car les yeux des enfants sont beaucoup plus perméables à la lumière que ceux des adultes.

La lumière bleue peut induire un stress oxydant au niveau des tissus irradiés. Or, un grand nombre de polluants chimiques de notre environnement causent, également, un stress oxydant.

Dans ce projet un nombre maximal de 200 rats seront exposés à 10 polluants environnementaux différents en dessous du seuil duquel ils provoquent des effets toxiques puis ils recevront une illumination par des lampes LED et une modification de la toxicité pour la rétine sera recherchée.

Parmi ces composés toxiques, les dérivés du pétrole tel que le Benzo-a-pyrène (BaP) ont des effets avérés sur la santé. Chez l'homme, la principale voie d'exposition est l'ingestion alimentaire. Son effet carcinogène est le plus connu mais il induit aussi des effets pro-inflammatoires et neurotoxiques. D'autres polluants sont, en revanche reconnus comme neurotoxiques comme les solvants couramment utilisés contenant du white spirit ou de l'acétone dont l'exposition chronique peut provoquer une encéphalopathie.

D'autres composés induisent des effets plus subtils mais très nocifs. C'est le cas des Triazines, tels que l'Atrazine, un des herbicides les plus utilisés dans le monde et auquel la population est très exposée. L'exposition chronique à ce produit induit des effets délétères sur les monoamines cérébrales. Ils ont été montrés aussi impliqués dans des maladies dégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.

Parmi les polluants courants, l'utilisation des nanoparticules (NPs) est croissante. Les NPs d'oxydes de métal se retrouvent dans de nombreux produits comme les peintures, les emballages ou l'alimentation. Les professionnels travaillant dans cet environnement y sont exposés surtout par voie respiratoire alors que la population générale y est exposée principalement par l'alimentation. Les connaissances sur la toxicité des nanoparticules sont restreintes. Cependant, des effets délétères ont été observés au niveau pulmonaire, cardiaque, vasculaire. Le SNC peut aussi être affecté par les NPs, car elles peuvent être captées et internalisées par les terminaisons nerveuses, puis être transportées vers le cerveau.

Le bisphénol A (BPA), de son côté, est utilisé dans les papiers thermiques. Due à son activité avérée de perturbateur endocrinien, les industriels ont commencé à remplacer le BPA par d'autres composés, notamment le bisphénol S (BPS) et le bisphénol F (BPF). Ces substances ne sont pas encore bien évaluées mais il a été montré qu'ils sont, également, capables de modifier la production de stéroïdes sexuels.

Le problème des effets combinés d'éléments toxiques est un enjeu majeur des évaluateurs de risques. Les effets de type "cocktail" sont très difficiles à estimer car on ne se limite pas à une addition d'effets. De ce fait, les risques peuvent être sous ou sur évalués. Les effets peuvent être synergiques ou antagoniques, chose difficile à prévoir. Or, la plupart des données toxicologiques disponibles portent sur les effets de substances agissant isolément, alors que dans le monde réel les organismes sont exposés à de nombreuses substances agissant de façon concomitante. La multiplicité des combinaisons interdit toute approche exhaustive, bien que leurs études s'avèrent nécessaire. D'ailleurs, parmi les cas d'interactions entre substances toxiques qui ont été décrits on estime entre 20 et 40 % la part des cas où des synergies ou des antagonismes sont observés.

Les effets de l'interaction des LED avec d'autres polluants (synergie ou antagonisme) sur la rétine n'ont pas été étudiés. A ce jour, quelques publications nous permettent de supposer qu'ils puissent exister. Ainsi, à titre d'exemple il a été montré que les NPs d'oxyde de zinc (ZnO) génèrent des espèces réactives oxygénées (ROS) et un stress oxydant en présence de lumière bleue. Par ailleurs, nous avons montré que la lumière bleue qui atteint la rétine produit une peroxydation lipidique et un stress oxydant généralisé. Or, ceci est également le cas de molécules comme le BaP qui génère un stress oxydant aussi bien dans le SNC que dans la rétine.

Ce travail vise à évaluer l'interaction de différents polluants avec la lumière des LED sur la rétine.

A terme, cette recherche vise à mieux appréhender les causes de la baisse de vision avec l'âge et le développement de pathologies rétinienne liées à l'âge. Les éléments investiguées ayant besoin de l'interaction entre els différentes cellules rétinienne, le tissu rétinien et les vaisseaux et la choroïde, cette recherche ne peut pas être faite que sur l'animal. Ce projet étant un projet de repérage des interactions néfastes entre lumière et polluants, les animaux seront utilisés en deux étapes. Dans une première étape 8 rats seront utilisés par polluant. Le manque de résultats de cette première étape entraînera une annulation de la deuxième et donc une économie de 12 animaux à chaque fois. De

ce fait le nombre maximal d'animaux sera de 200 et le minimal de 80. Les animaux seront surveillés pendant le traitement et toute altération du comportement entraînera un arrêt de l'expérience.

**8768** Des résultats obtenus par divers laboratoires ont montré que la flore intestinale avait un rôle fondamental dans le développement du système immunitaire. Au sein de notre laboratoire, nous avons démontré son rôle clé dans la croissance tumorale et l'efficacité de traitements contre le cancer. En effet, ces résultats montrent que certaines bactéries de la flore intestinale permettent d'induire une réponse immunitaire qui limite la croissance tumorale. De plus, les chimiothérapies et immunothérapies connues pour activer le système immunitaire nécessitent certaines bactéries de la flore pour être efficace contre la tumeur. A l'heure actuelle, il n'y a aucune donnée concernant l'implication de la flore intestinale dans les tumeurs pédiatriques.

Notre objectif est d'analyser l'influence de la flore intestinale dans la croissance tumorale naturelle du neuroblastome. Par ailleurs, nous souhaitons étudier son implication dans le développement immunitaire anté- et néonatal.

Pour cela, nous décontaminerons les souris et étudierons les effets induits sur le système immunitaire et la croissance tumorale. Ces expérimentations vont nous permettre de déterminer si la flore intestinale est impliquée dans la croissance naturelle du neuroblastome (cancer pédiatrique extra-cérébral du tissu nerveux) et si nous pouvons envisager une supplémentation en bactéries comme traitement adjuvant (additionnel) aux traitements anti-cancéreux. Les flores intestinales des animaux seront supprimées grâce à des mélanges d'antibiotiques (décontamination), puis des bactéries seront données aux animaux en adjuvant. Les contraintes principales pour les animaux seront liées à l'installation de tumeurs par voie sous-cutanée (dont la croissance sera limitée et mesurée très régulièrement). Les prélèvements seront des prélèvements de sang du vivant des animaux. Toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme du fait de sa complexité (avec toutes les interactions entre la flore intestinale, le système immunitaire et la croissance de tumeurs). Le projet nécessitera 1014 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différents protocoles de décontamination et types de cellules tumorales utilisés. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentations. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant du bien-être animal en réduisant au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux par recours à l'anesthésie. Le milieu des animaux sera enrichi en tout temps par le moyen de maisons en carton et de cotons (cocons). Les tumeurs internes seront suivies grâce à un système d'imagerie in vivo (IVIS) et leur croissance sera limitée.

**8769** La leucémie myéloïde aiguë (LAM) est un cancer hétérogène caractérisé par un blocage de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la lignée myéloïde en cellules immunitaires matures : monocytes, granulocytes, globules rouges... Elle entraîne ainsi une prolifération excessive de cellules immatures, les blastes myéloïdes, dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Les cellules blastiques prennent la place des cellules sanguines matures, les empêchant ainsi d'accomplir leurs fonctions.

Le traitement standard, appelé thérapie d'induction est très efficace pour tuer les cellules cancéreuses de LAM. Malgré un taux élevé de rémission complète après le traitement par ces agents cytotoxiques, la survie globale à 5 ans est très mauvaise (20%). En effet, la plupart des patients rechutent à cause d'une repousse tumorale initiée par des cellules leucémiques chimiorésistantes (RLCs).

Il devient donc primordial d'anticiper ces rechutes et d'y remédier avant qu'elles n'apparaissent. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la résistance thérapeutique mais aucune

n'a conduit à une compréhension complète des mécanismes moléculaires de la résistance à la LAM, en particulier in vivo, ni à de nouvelles thérapies, qui permettraient d'éradiquer efficacement les RLCs. Le but de ce projet est de comprendre et suivre le comportement de ces cellules in vivo dans un modèle murin afin de créer des stratégies thérapeutiques appropriées et innovantes.

Ce projet s'intéresse au suivi des cellules leucémiques humaines de LAM issues de patients ou de lignées cellulaires - injectées seules ou en association avec d'autres cellules humaines in vivo chez la souris immunodéficiente. Ce modèle permet de générer de nombreuses informations sur les mécanismes de chimiorésistance. Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera l'utilisation de 8000 souris.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet comme suit :

-Remplacement : Les modèles in vitro existants de LAM seront utilisés en première intention mais ces modèles ne permettent pas d'étudier le développement de la tumeur au sein de son microenvironnement ainsi que son évolution dans un organisme vivant, l'utilisation de modèles in vivo est justifié.

-Réduction : Les effectifs des cohortes sont calculés et ainsi limités par un logiciel de simulation et l'outil statistique (test de Mann et Whitney). Des études antérieures effectuées nous ont permis d'optimiser l'utilisation de ces modèles murins, permettant de ce fait d'en réduire le nombre. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

-Raffinement : L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures, sur l'état de santé global des animaux. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement, anesthésie) et les études antérieures nous ont permis de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement par un personnel qualifié afin de réaliser ce contrôle et d'évaluer leur état, tout en prenant en compte l'expérimentation.

La plupart des procédures décrites dans ce projet ont déjà obtenu l'accord d'un comité d'éthique pour l'expérimentation animale précédemment.

#### **8770** • Thème de Recherche :

Apprentissage des gestes et techniques de radiologie interventionnelle vasculaire, et connaissance des dispositifs utilisés pour les procédures (embolisation, anévrisme, thrombectomie, etc.).

Cette formation s'adresse d'une part à un public de médecins, radiologues, chirurgiens, gastro-entérologues (entraînement/formation), mais également aux manipulateurs en radiologie, aux techniciens, ainsi qu'aux commerciaux des sociétés (formation sur les dispositifs de la société).

• Utilité et nécessité des expériences sur l'animal,

Il n'existe aujourd'hui, aucun moyen autre que l'expérimentation sur le vivant, pour l'apprentissage des gestes chirurgicaux et de radiologie interventionnelle utilisant les nouvelles techniques et approches chirurgicales et/ou interventionnelles.

La formation se fait habituellement par compagnonnage, pas toujours accessible et en tous cas insuffisant pour l'apprentissage de gestuelle et techniques nouvelles et complexes.

Les simulateurs, actuellement en développement, ne permettent pas une éducation satisfaisante.

• Justification du choix de l'espèce, et du modèle :

Le porc fermier est l'animal de référence pour différentes raisons : son anatomie présente tous les éléments nécessaires à la reproduction des procédures humaines ; l'approche vasculaire est très réaliste par rapport aux conditions de la chirurgie humaine, son coût est raisonnable par rapport aux bénéfices escomptés.

Des modèles d'anévrisme et de thrombose seront réalisés chez le Porc pour mimer les pathologies observées chez l'Homme, rendant l'utilisation de ce modèle encore plus pertinente.

Respect des 3R :

Remplacement :

La seule méthode alternative serait l'existence de simulateurs soit informatique ou utilisant des modèles en silicone de la vascularisation humaine. Ceux existant ne permettent pas la réalisation de

procédures complexes de façon réaliste, et ne prennent pas en compte les situations difficiles inhérentes à l'acte interventionnel (hémorragie, nécrose, viabilité des organes...).

Il n'existe à ce jour pas d'alternative au modèle animal.

Les chirurgiens ou radiologue n'en disposant pas débutent leur apprentissage directement chez les patients. L'éducation sur modèle animal reste aujourd'hui la plus pertinente.

Réduction :

Chaque animal est utilisé au cours d'une séance par deux à trois intervenants. Plusieurs sites d'interventions (anévrisme, thrombose, malformation artério-veineuse) sont créés sur le même animal permettant la réalisation d'un maximum de procédures, et donc l'exploitation maximale du modèle.

Le nombre d'animaux mis en œuvre est adapté précisément au nombre de participants à la formation.

Dans la majorité des cas, les formations font appel à deux modalités d'imagerie (ZeeGo, C-Arm), avec ainsi une capacité de 2 porcs par session d'une demi-journée. Les autres modalités présentes sur le plateau technique (IRM, CT scan et échographie) peuvent aussi être sollicitées selon les besoins.

Le nombre d'animaux utilisé se situe donc habituellement entre 2 et 4 par jour de formation. Les sessions se déroulent 20 fois par an, soit un maximum de 400 animaux sur 5 ans.

Raffinement :

Les procédures ont peu de répercussion sur l'état psychologique des animaux. Ceux-ci sont prémédiqués afin d'éviter tout stress inutile avant d'être amenés au bloc opératoire. Ils sont immédiatement endormis sous anesthésie générale pour palier à toutes souffrances éventuelles, et ne sont pas réveillés en fin de procédure.

**8771** Dans le système nerveux, les cellules nerveuses en charge du traitement de l'information sont les neurones. Ils sont composés d'un corps cellulaire, d'un prolongement long dit axone et de prolongements plus courts les dendrites. L'information nerveuse se propage le long de l'axone par des petits courants électriques appelés potentiels d'action pour se transmettre aux dendrites des autres neurones avec lesquels il est connecté. Cette communication se fait au niveau de la synapse où le signal électrique est converti en signal chimique. Cette synapse est donc faite de 3 éléments : la terminaison du neurone présynaptique, la fente synaptique et la terminaison du neurone postsynaptique. Quand le signal électrique arrive au niveau de la présynapse, un neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique et comme une clé dans une serrure, va activer des récepteurs spécifiques insérés dans la membrane du neurone postsynaptique. Ces récepteurs codent le signal obtenu en sortie en un signal électrique capable à nouveau de se propager. La neurotransmission peut donc être excitatrice, inhibitrice ou modulatrice. La transmission excitatrice se fait principalement grâce au glutamate, un acide aminé. Les récepteurs spécifiques qui lui sont associés sont regroupés en 3 familles (AMPA, NMDA, et kainate). Les AMPA et les NMDA permettent le phénomène de potentialisation à long terme (ou LTP en anglais) qui est un renforcement persistant des synapses en produisant une augmentation de longue durée dans la transmission du signal entre deux neurones. On admet que ce phénomène de LTP permet la formation des différents types de mémoire et sa perturbation est impliquée dans beaucoup de type de maladies psychiatriques comme la schizophrénie.

Notre groupe étudie donc la mobilité de ces récepteurs et l'implication d'une perturbation de cette mobilité dans un modèle de schizophrénie. Notre projet utilisera un modèle rongeur de schizophrénie basé sur l'exposition pendant la gestation au méthazoxyméthanol acetate (MAM), qui entraîne chez les animaux des déficits semblables à ceux observés chez les schizophrènes. Ce modèle expérimental nécessite le recours à l'animal afin de reproduire les symptômes chez le rongeur. Chez les rats exposés au MAM, nous allons chercher soit à stimuler la mobilité des récepteurs soit à les immobiliser en injectant dans l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans la formation de la mémoire et qui est détériorée chez les schizophrènes, différentes molécules capables d'agir sur la mobilité des récepteurs (anticorps, peptides compétiteurs). Nous souhaitons voir si une modification expérimentale de la mobilité des récepteurs permet d'améliorer les symptômes associés à cette maladie. Ces injections auront lieu entre le 9ème et le 13ème jour post-natal, une période critique du développement cérébral où s'établissent les connexions entre neurones et durant laquelle nous avons obtenu des données « in vitro » de l'effet du MAM. Quand ces animaux auront 2 mois, au stade

où devraient apparaître les symptômes pathologiques, nous allons évaluer les conséquences de ces modulations de mobilité par un test comportemental indolore qui permet de détecter des altérations des capacités cérébrales symptomatiques de la schizophrénie. Le cerveau de ces animaux sera ensuite prélevé après leur euthanasie pour étudier en électrophysiologie et en imagerie l'impact des changements de mobilité des récepteurs sur le fonctionnement des réseaux de neurones. A titre de contrôle, les mêmes expériences seront faites sur un groupe d'animaux dont la mère aura reçu au même stade de gestation une injection intrapéritonéale de solution saline. Dans le respect du R de réduire dans la règle des 3R, la solidité des statistiques nécessite des groupes de 12 animaux pour le test comportemental mis en œuvre pour détecter les perturbations de mobilité des récepteurs. Au total, 12 lots pour tester différentes molécules capables de modifier la mobilité des récepteurs de 12 animaux seront nécessaires à la réalisation du projet, soit un total de 144 animaux. Dans le respect du R de raffiner de la règle des 3R, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Des points limites suffisamment prédictifs seront définis pour réduire la souffrance tout au long de la vie de l'animal.

**8772** Au sein du laboratoire, nous portons un vif intérêt à la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés aux ciliopathies, maladies rares dues à un défaut de fonctionnement du cil primaire. Au niveau de la rétine, le cil primaire constituant le cil connecteur des photorécepteurs assure le transport de protéines d'un compartiment à l'autre de la cellule permettant ainsi le bon fonctionnement du photorécepteur. Des études antérieures sur la dégénérescence rétinienne ont démontrées qu'un défaut ciliaire causait un dysfonctionnement dans la machinerie de transport conduisant à une accumulation des protéines et à un stress pour celui-ci. En réponse à ce stress, des voies de signalisation sont alors activées pour réduire la quantité de protéines. Lorsque cette accumulation ne peut être enrayée, l'activation de ces mêmes voies conduit à la mort des photorécepteurs et au phénotype de rétinopathie pigmentaire. En se basant sur ces connaissances scientifiques, une approche pharmacologique a été développée sur un modèle murin de ciliopathie, mimant le syndrome Bardet-Biedl (BBS). Ce traitement est composé de deux principes actifs : le guanabenz (GBZ) et l'acide valproïque (VPA). Cette combinaison a pu ralentir la mort des photorécepteurs et ainsi retarder la perte d'acuité visuelle chez ces souris.

Le projet vise à optimiser ce traitement et son mode d'administration ainsi qu'à élargir son utilisation à des dégénérescences rétiniennes plus fréquentes comme celles induites par des mutations dans la rhodopsine (protéine photosensible des bâtonnets), notamment la mutation P23H de la rhodopsine qui est une cause majeure (restant une maladie rare) de dégénérescence rétinienne non syndromique. Cette mutation entraîne la production de rhodopsine non fonctionnelle conduisant in fine à des mécanismes physiopathologiques similaires à ceux observés dans le modèle BBS. De ce fait, ce modèle est pertinent pour tester notre traitement et l'optimiser.

Le modèle utilisé sera un modèle plus pertinent et proche de la maladie humaine, le modèle murin mutant de la rhodopsine P23H-KI (knock-in). Ce modèle murin permet de réaliser des tests tel que l'optomoteur et l'électrorétinogramme qui permettent de mesurer les capacités visuelles reflet de la dégénérescence rétinienne de notre modèle, ces tests sont des tests applicables à l'homme ce qui les rend pertinents dans le cadre de ce projet. L'administration systémique du traitement ne peut se faire que sur animal vivant et permet de voir d'éventuels effets secondaires de celui-ci. L'ensemble de l'étude sera réalisé dans le respect de la règle des 3R afin de s'assurer d'utiliser le minimum d'animaux et de veiller aux meilleures conditions pour ceux-ci. Les souris seront produites par croisement in situ et seront placées dans les conditions optimales de température avec un cycle jour/nuit de 12/12h, avec un accès à volonté à l'eau et à la nourriture et surveillées quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Les critères d'évaluation des animaux vigiles seront le poids, l'aspect général de la souris, son comportement dans la cage ainsi qu'avec ses congénères (au maximum 3 par cages).

La première étape sera une caractérisation de ce modèle, nous nous intéresserons notamment à l'effet de la lumière sur la dégénérescence rétinienne. Il a en effet été démontré que la lumière pouvait impacter la progression de la maladie. Les analyses seront faites sur des souris P23H-KI ayant été exposées ou non à la lumière versus aux contrôles non porteurs de la mutation (Wild-type, WT). La dégénérescence débutant dès l'ouverture des yeux, les prélèvements rétiniens seront faits

précocement à 14, 18 et 21 jours pour l'analyse moléculaire et histologique et des électrorétinogrammes (sous anesthésie) seront réalisés à 1 mois. La taille de la rétine limitant le nombre d'analyse possible sur un même échantillon, 108 souris seront nécessaires pour cette étude (72 P23H-KI et 36 WT). Ce nombre étant le nombre minimal d'animaux nécessaire pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement exploitables par des tests de Student (avec un risque  $\alpha$  de 5% et une puissance de 80%). Cette caractérisation permettra de déterminer si le modèle est qualifié pour le traitement et de déterminer la fenêtre thérapeutique optimale pour l'administration de ce traitement.

Pour la seconde étape, cinq traitements seront testés : GBZ seul, VPA seul, IFB-088 seul (un dérivé du GBZ n'ayant pas son activité hypotensive) et les combinaisons GBZ+ VPA et IFB-088+ VPA permettant ainsi de voir l'effet de chaque molécule sur la dégénérescence rétinienne mais également l'effet synergique des composés testés en combinaison. Différents modes d'administration seront testés : locale par injection intra vitrée (sous anesthésie par injection de Kétamine/Domitor) et systémique par gavage. L'effet des traitements sera évalué par la mesure de l'acuité visuelle réalisée sur animaux vigiles ainsi que l'état d'avancement de dégénérescence rétinienne (même tests que précédemment). Les tests seront tout d'abord réalisés à 1 mois après le début du traitement puis à 2 mois et 3 mois si cela est nécessaire pour déterminer l'effet à long terme du traitement sur la dégénérescence rétinienne. Toujours limité par la taille de la rétine, l'ensemble des tests nécessiteront 1350 souris, ils permettront de déterminer la dose ainsi que la fréquence optimale d'administration.

Ce projet devrait permettre de développer un traitement pharmacologique capable de ralentir la dégénérescence rétinienne associée aux ciliopathies mais également à d'autres rétinopathies impliquant l'activation des mêmes voies de réponse au stress en particulier dans le cas de la mutation P23H de la rhodopsine.

**8773** Environ 15% des cas d'infertilité masculine ont une origine immunologique, de l'inflammation chronique à la réaction auto-immune qui détruit les spermatozoïdes. Notre objectif est d'acquérir une meilleure connaissance du système immunitaire et de son organisation au sein des organes sexuels mâles, et plus particulièrement au niveau post-testiculaire (épididymaire). En effet, suite à leur production dans le testicule, les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant au cours d'une phase de maturation post-testiculaire se déroulant au sein de l'épididyme. Du point de vue immunologique, il y a un véritable challenge : contrôler efficacement les pathogènes ascendants le tractus génital tout en évitant une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes spermatiques étrangers à la librairie immune de l'individu.

Le rôle du système lymphatique dans le transport et l'acheminement des cellules de l'immunité est primordial pour une réponse immunitaire adaptée et efficace. Bien que la relation entre réponse immunitaire et la vascularisation lymphatique soit établie depuis de nombreuses années dans bon nombre d'organes elle reste encore méconnue au niveau de l'épididyme. Afin de comprendre la réponse immunitaire dans cet organe il est nécessaire de savoir qu'elle est la vascularisation lymphatique et quelle est sa relation avec l'épithélium épидидymaire. Pour cela nous souhaitons réaliser différents marquages immunologiques avec des marqueurs lymphatiques sur des épидидymes dont la vascularisation sanguine sera révélée par injection intraveineuse de bleu Evans. Nous souhaitons répondre à cette question en comparant 3 approches d'imagerie différentes :

- coupes paraffine sériées, couplées à une reconstruction 3D des images prises par un scanner de lames confocal,
- transparençation de l'organe par imagerie bi-photons sur organe entier,
- marquages in totaux (whole-mount) des vaisseaux sanguins et lymphatiques couplés à la technique d'imagerie Apotome.

Les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques présentent de nombreuses caractéristiques communes. Pour les distinguer au sein de l'organe, nous disposons de souris transgéniques qui expriment un allèle du gène VEGFR3 couplé à la Yellow Fluorescent Protein transformant ainsi les vaisseaux lymphatiques et certains vaisseaux sanguins en vaisseaux fluorescents quand ils sont soumis à un rayonnement laser à 488nm. Aussi pour distinguer de façon précise la vascularisation exclusivement sanguine nous utiliserons la propriété du Bleu Evans d'auto fluorescé à 647 nm. Le

Bleu Evans est un marqueur couramment utilisé pour mesurer la perméabilité des vaisseaux sanguins.

Notre choix du modèle murin repose sur le fait que la souris est un modèle de référence en immunologie : en effet, de nombreux mécanismes, cellules immunitaires et cytokines sont communs à l'homme et à la souris. De plus, la souris est le seul modèle animal permettant de visualiser par fluorescence les vaisseaux lymphatiques qui nous intéressent dans ce projet. Enfin, notre étude portant sur l'immunité des organes reproducteurs mâles, nous utiliserons des souris mâles sexuellement matures, âgées de trois à six mois.

L'injection rétro-orbitale est réalisée sous anesthésie générale précédée d'une pré-anesthésie diminuant le stress et la souffrance de l'animal. De plus, la souffrance est modérée selon les critères officiels (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales). Suite à cette injection et à sa distribution, les animaux seront euthanasiés selon une méthode réglementaire. Le recours au modèle animal est ici incontournable étant donné les nombreuses interactions inter-organes et la distance à laquelle les cellules/molécules de l'immunité agissent.

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous avons effectué un test de puissance statistique préalable. Étant donné la question biologique posée dans ce projet et les difficultés techniques, nous estimons qu'environ 25 souris sauvages et 25 souris transgéniques seront nécessaires pour mener à bien l'ensemble du projet. L'utilisation des souris sauvages nous permettra les mises au point techniques, notamment pour le protocole de transgénisation, sans faire appel aux souris transgéniques qui présentent des difficultés de reproduction. Une fois le protocole bien établi l'expérimentation sera réalisée sur 4 individus transgéniques différents afin d'avoir une image représentative de la vascularisation du tissu.

**8774** Notre vie quotidienne est une chaîne complexe et discontinue de décisions et d'actions qui définissent nos comportements. Face à une situation de choix, chaque individu tendra à sélectionner la meilleure action possible parmi l'ensemble des alternatives possibles. Ce processus de « prise de décision » intervient sur la base d'une évaluation subjective propre à chaque individu des coûts et bénéfices de chaque action. Le cortex préfrontal a émergé comme un acteur crucial de ce processus. Les mécanismes synaptiques et neuronaux restent cependant peu connus à ce jour. En utilisant l'imagerie biphotonique chronique chez l'animal vigile confronté à une situation de choix, notre projet de recherche visera d'abord à déterminer comment les différents choix sont encodés au cours de l'apprentissage par des représentations neuronales spécifiques au sein du cortex préfrontal, et comment celles-ci sont évaluées et comparées au cours d'une prise de décision afin de produire la meilleure action possible (Objectifs 1 et 2). Par ailleurs, afin d'assurer des comportements flexibles dans un environnement en constante évolution, chaque individu doit rapidement réévaluer ces représentations en fonction de la différence entre les conséquences attendues de chaque action et celles véritablement expérimentées par l'animal. Bien que la coordination de nombreuses structures corticales et sous-corticales soit supposée essentielle à cette flexibilité, les mécanismes synaptiques sous-jacents restent inconnus à ce jour. Notre projet tirera partie des méthodes *in vivo* les plus modernes (optogénétique, imagerie calcique) afin de déterminer les relations causales entre les dynamiques sous-corticales et le traitement de l'information dans le cortex préfrontal au cours de la prise de décision et des comportements flexibles (Objectif 3). Enfin, étant donné les déficits motivationnels observés dans de nombreuses maladies neuropsychiatriques humaines, nous étudierons les déficits cellulaires et comportementaux au cours de la prise de décision chez un de nos modèles murin d'autisme (KO IL1RAPL1) (Objectif 4).

Ainsi, nous nous proposons de mettre en place ici de nouvelles méthodes innovantes et des stratégies sophistiquées chez l'animal vigile afin de résoudre plusieurs questions fondamentales des neurosciences :

-Objectifs 1&2 : étant donné que la comparaison entre différentes alternatives doit intervenir dans le cortex avant le choix lui-même et la mise en place d'une réponse motrice, ces différentes alternatives sont-elles encodées par des représentations neuronales spécifiques ? Sont-elles préexistantes (innées), ou bien acquises par un processus d'apprentissage ?



-Objectif 3 : étant donné que la valeur subjective d'une action est encodée dans plusieurs structures corticales grâce au soutien de structures sous-corticales, comment ces différents systèmes coopèrent-ils pour implémenter la valeur d'une action et influencer une nouvelle prise de décision ?

-Objectif 4 : étant donné l'altération des processus de prise de décision observée dans de nombreuses maladies psychiatriques, y compris l'autisme, les mécanismes synaptiques et neuronaux impliqués dans la prise de décision sont-ils modifiés chez un de nos modèles murins de l'autisme (KO IL1RAPL1) ?

L'ensemble des méthodes et des stratégies expérimentales utilisées sont résumées dans la figure 1 de l'annexe.

L'étude des mécanismes de la prise de décision est donc un enjeu sociétal et économique majeur des neurosciences modernes, comme le relèvent de nombreuses situations humaines inadaptées (prise de risque, addiction au jeu, comportement compulsif...). Par définition, ces mécanismes ne peuvent être étudiés que chez des animaux vigiles confrontés à une situation de choix. Dès lors, aucun des modèles in vitro ne peut être utilisé ici. Une centaine d'animaux sera utilisée dans notre projet. Pour le respect de la règle des 3R, la solidité de nos hypothèses de travail (vérifiée par des expériences pilotes), la nature innovante des méthodes utilisées (imagerie chronique), ainsi que la qualité de la mise en œuvre des procédures (basée sur une expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de réduire significativement le nombre des animaux. Par exemple, l'utilisation de l'imagerie biphotonique chronique permet de réduire le nombre d'animaux au moins par deux, puisque chaque souris constitue son propre contrôle. De plus les douleurs liées aux chirurgies seront scrupuleusement contrôlées et soulagées par des molécules anesthésiques et antalgiques efficaces.

**8775** Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de nouveaux vaccins équins. Les évaluations sont faites sur l'espèce cible, qui sont pour ce projet des poneys ou chevaux. Cette évaluation nécessite l'injection de doses vaccinales.

Trois types d'études sont envisagés :

1/ Etude d'efficacité

Après injections du nouveau vaccin, des prélèvements de sang sont réalisés dans le but d'évaluer la réponse immunitaire par titrage des anticorps présents dans le sang. Ces échantillons peuvent être complétés par des prélèvements par écouvillonnage nasal.

Les effets secondaires liés à la vaccination sont également évalués. Pour cela les animaux sont quotidiennement observés et les symptômes vaccinaux notés jusqu'à leur disparition.

2/ Etude d'innocuité

Le but est de vérifier l'innocuité du candidat vaccin et que l'agent vaccinal ne se diffuse pas dans l'environnement.

Les animaux sont vaccinés. Des prélèvements sanguins sont réalisés afin de suivre la virémie. Exceptionnellement, les autorités sanitaires pourraient exiger une étude des tissus musculaires. Dans ce cas, les animaux seraient euthanasiés. Les animaux font également l'objet d'un examen clinique quotidien tout au long de l'étude (observation de potentiels effets secondaire, suivi de température). Compte tenu des données historiques, les nouveaux vaccins n'ont pas entraîné de signes cliniques notables, les procédures sont donc classées niveau de gravité léger.

Pour les vaccins de type recombinant une étude de diffusibilité est exigée par la réglementation, en vue de la commercialisation du futur vaccin.

La diffusibilité est étudiée à l'aide de prélèvements d'urine, d'écouvillons nasaux, oculaires, buccaux ou rectaux.

3/ Etude d'épreuve

Afin de mesurer l'efficacité de la vaccination, une épreuve peut être requise. Dans ce cas, l'agent infectieux est inoculé aux animaux vaccinés. Les animaux non protégés ou insuffisamment couverts, développent des signes cliniques et reçoivent alors les soins nécessaires à leur guérison et leur confort. En raison de ce risque, les procédures sont classées comme modérées en termes de gravité. Pendant la phase d'épreuve, des prélèvements de sang sont effectués et peuvent être complétés par des écouvillonnages nasaux.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative au recours à l'animal permettant d'évaluer l'efficacité ou l'innocuité des candidats vaccins. Un nouveau vaccin doit être testé dans l'espèce cible avant d'obtenir une autorisation de commercialisation.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisé est limité au mieux, de façon à répondre aux exigences réglementaires et scientifiques des études. La variabilité individuelle des réponses à la vaccination contraint à constituer des groupes représentatifs de 10 animaux pour les études nécessaires au dossier d'enregistrement des médicaments.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire diagnostique la maladie et prescrit un traitement.

Animaux concernés :

300 animaux, chevaux et poneys, sont prévus pour la durée du projet (5 ans).

Les procédures expérimentales n'étant pas invasives, les animaux peuvent être inclus dans plusieurs études sur d'autres vaccins équin.

**8776** Les populations de saumon Atlantique et de truites de mer (Salmonidés) ont chuté de 70% depuis les années 1970. Le Conseil International pour l'Exploitation de la Mer (CIEM) et l'Agence Française pour la Biodiversité (AFB) ont émis l'hypothèse que la survie de ces Salmonidés était faible dans les eaux estuariennes et côtières. Pourtant, la phase marine de ces espèces vivant une partie de leur cycle de vie en rivière et l'autre partie en mer, souffre d'un manque de connaissance pour avoir une gestion adaptée. L'étude des migrations et de la survie des Salmonidés dans les eaux estuariennes et côtières s'inscrit dans un projet européen de plus grande ampleur visant à combler le manque de connaissance sur la phase marine des Salmonidés et à améliorer la gestion de ces espèces exploitées par la pêche.

Dans ce but, la première migration estuarienne des juvéniles de saumons et truites de mer sera suivie par une méthode acoustique passive. Le signal émis par un implant acoustique (transmetteur) dans la cavité abdominale des poissons est réceptionné lors du passage à proximité des stations de réception disposées stratégiquement sur leur route migratoire dans 2 estuaires. Annuellement, 60 juvéniles de saumons Atlantique seront marqués dans chacun des 2 fleuves suivis ainsi que 60 juvéniles de truites de mer sur 1 seul fleuve (pas de truites de mer dans le second fleuve). Ce suivi sera réalisé aux printemps 2018 et 2019, ce qui fait un total de 360 juvéniles (240 saumons Atlantique, 120 truites de mer).

Parallèlement, les truites de mer adultes, effectuant plusieurs migrations en mer, seront équipées de marques électroniques enregistrant régulièrement la température et la pression. Ces paramètres permettront de calculer a posteriori leur route migratoire et ainsi d'identifier les habitats côtiers et pélagiques que l'espèce fréquente pendant sa phase marine. 50 truites de mer adultes seront équipées par an lors de leur dévalaison post reproduction en hiver. Ce suivi sera réalisé en 2018 et 2019 sur 1 seul fleuve, ce qui fait un total de 100 individus.

Remplacement : l'objectif étant l'apport de connaissances sur les routes migratoires de ces deux espèces, le remplacement est impossible.

Réduction : le nombre de juvéniles marqués a été défini pour acquérir suffisamment de données pour calculer la mortalité lors de leur migration estuarienne tout en limitant les interférences entre les marques acoustiques.

Le nombre de truites de mer adultes marqué est fortement lié au taux de retour de ces poissons qui est de quelques % en milieu naturel. Le nombre de poissons marqués devrait nous permettre de recapter environ 6 individus lors de leur retour sur le fleuve. Une vingtaine de marques supplémentaires devraient être récupérées via les pêcheurs, capturant les individus dans leurs filets, et les promeneurs sur les plages, récupérant les marques des poissons morts en mer ramenées par le courant.

Raffinement : les poissons seront anesthésiés avant toutes manipulations avec une solution de benzocaïne (concentration de 40 mg/L), puis seront surveillés par une personne compétente pendant leur phase de récupération.

**8777** Les pathologies malignes du pancréas ont un mauvais pronostic. Selon l'American Cancer Society, aux États-Unis, le taux de survie à 5 ans chez les personnes atteintes d'un cancer du pancréas de stade IA est d'environ 14%. La résection chirurgicale est le meilleur traitement curatif qui peut être offert. La résection chirurgicale est associée à une période postopératoire inconfortable, ainsi qu'à des complications peropératoires, telles que l'hémorragie des gros vaisseaux, des complications postopératoires immédiates telles que la fistule pancréatique ou des infections, des complications postopératoires lointaines telles que le diabète et les troubles digestifs. Tout cela se traduit par une morbidité et une mortalité élevées.

L'introduction de l'échographie endoscopique (EUS) a représenté une grande avancée pour les interventions endoscopiques guidées. En ce qui concerne les lésions localisées dans le pancréas, elle a permis non seulement d'améliorer le diagnostic des lésions solides ou kystiques, mais aussi d'effectuer des biopsies et un drainage de ces lésions. Ces possibilités d'application ont augmenté avec l'introduction de l'ablation trans-gastrique guidée par EUS, dont les indications sont un adénocarcinome pancréatique avancé inopérable des patients après chimiothérapie, des patients avec une croissance tumorale progressive entraînant une obstruction des voies biliaires ou gastriques, des métastases hépatiques, des néoplasmes papillaires mucineux intraductaux (IPMN), MCN, insulinome, gastrinome et autres petits TNE.

D'autre part, les procédures vasculaires guidées par EUS ont commencé. Par exemple, prise en charge des hémorragies digestives supérieures non variculaires, prise en charge des hémorragies variqueuses, prise en charge des pseudo-anévrysmes, embolisation du système veineux portal et création de shunts porto-systémiques.

Les avancées dans les procédures guidées par EUS permettraient de réduire les complications associées aux grandes résections, sans pour autant perdre l'intention curative sur la pathologie traitée.

L'objectif de ce protocole est de développer de nouvelles techniques chirurgicales de résection du pancréas tout en assurant la préservation des tissus restant. Des techniques mini-invasives incluant la mini-embolisation artérielle et l'ablation radiofréquence localisée du tissu pancréatique seront réalisées par voie écho-endoscopique. Les essais précliniques seront conduits sur un modèle animal porcin avant que ces techniques ne soient appliquées chez les patients. Un modèle de tumeur du pancréas sera réalisé et les animaux répartis en 2 groupes seront soumis à une pancréatectomie segmentaire thérapeutique soit par endoscopie trans-gastrique soit par laparoscopie.

13 animaux seront nécessaires pour ce projet de recherche, dans le respect de la règle des 3 R :

**Remplacement :** La seule méthode alternative serait l'existence de simulateurs informatique ou utilisant des modèles en silicone de l'anatomie humaine. Ceux existant ne permettent pas la réalisation de procédures complexes de façon réaliste, et ne prennent pas en compte les situations difficiles inhérentes à l'acte interventionnel (hémorragie, nécrose, viabilité des organes, éviter les possibles complications, perforation).

Il n'existe à ce jour pas d'alternative au modèle animal adaptée pour ce projet.

Les chirurgiens-gastroentérologues endoscopistes débutent leur apprentissage directement chez les patients. L'éducation sur modèle animal reste aujourd'hui la plus pertinente.

**Réduction :**

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables permettant d'envisager une application chez l'homme. Nous avons estimé qu'un maximum de 13 animaux seront opérés incluant 4 animaux bénéficiant d'une pancréatectomie thérapeutique sélective guidée par EUS dans la tête, 4 au niveau du corps et enfin 5 au niveau de la queue du pancréas. Ce protocole représente une utilisation maximum de 13 porcs répartis en 2 groupes. Le premier groupe comprend un animal pilote afin d'évaluer et d'adapter si nécessaire le protocole d'antidouleur post-opératoire aux animaux suivants.

**Raffinement :**

Le protocole prévoit des procédures mini-invasives pouvant engendrer des douleurs post-opératoires modérées à sévère en cas de complication. Les animaux recevront un protocole de soins post-opératoire strict comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs/anti-inflammatoires et antibiotiques, un régime standardisé et un environnement enrichi. Des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue d'une complication ont été définis.

**8778** Les pathologies malignes du pancréas ont un mauvais pronostic. Selon l'American Cancer Society, aux États-Unis, le taux de survie à 5 ans chez les personnes atteintes d'un cancer du pancréas de stade IA est d'environ 14%. La résection chirurgicale est le meilleur traitement curatif qui peut être offert. Cette intervention chirurgicale est associée à une période postopératoire inconfortable, ainsi qu'à des complications : hémorragie des gros vaisseaux ; complications postopératoires immédiates comme la fistule pancréatique ou des infections ; complications postopératoires lointaines telles que le diabète et les troubles digestifs. Tout cela se traduit par une morbidité et une mortalité élevées. L'introduction de l'échographie endoscopique (EUS) a représenté une grande avancée pour les interventions endoscopiques guidées. En ce qui concerne les lésions localisées dans le pancréas, elle a permis non seulement d'améliorer le diagnostic des lésions solides ou kystiques, mais aussi d'effectuer des biopsies et un drainage de ces lésions. Ces possibilités d'application ont augmenté avec l'introduction de l'ablation trans-gastrique guidée par EUS, dont les indications sont un adénocarcinome pancréatique avancé inopérable, des patients après chimiothérapie, des patients avec une croissance tumorale progressive entraînant une obstruction des voies biliaires ou gastriques, des métastases hépatiques, des néoplasmes papillaires mucineux intraductaux (IPMN), MCN, insulinome, gastrinome et autres petits TNE. D'autre part, les procédures vasculaires guidées par EUS ont commencé. Par exemple, prise en charge des hémorragies digestives supérieures non varicueuses, prise en charge des hémorragies variqueuses, prise en charge des pseudo-anévrysmes, embolisation du système veineux portal et création de shunts porto-systémiques. Les avancées dans les procédures guidées par EUS permettraient de réduire les complications associées aux grandes résections, sans pour autant perdre l'intention curative sur la pathologie traitée. Ce projet vise donc à former les professionnels à l'utilisation de ces nouvelles technologies innovantes et micro-invasives pour le traitement des pathologies bilio-pancréatiques. Cet enseignement s'adressera à des chirurgiens-gastroentérologues-endoscopistes experts qui souhaitent maîtriser les techniques d'EUS interventionnelle dans le cadre du traitement des pathologies pancréatiques et biliaires incluant le drainage des collections péri-gastriques et le drainage de la vésicule et des voies biliaires intra et extra hépatiques. Après une session test réalisée par quatre experts gastroentérologues endoscopistes, des sessions annuelles de formation seront proposées avec un enseignant expert pour encadrer un maximum de 4 participants. 825 porcs au maximum seront utilisés pour ce projet dans le respect de la règle des 3R : Remplacement : La seule méthode alternative serait l'existence de simulateurs soit informatique ou utilisant des modèles en silicone de l'anatomie humaine. Ceux existant ne permettent pas la réalisation de procédures complexes de façon réaliste, et ne prennent pas en compte les situations difficiles inhérentes à l'acte interventionnel (hémorragie, nécrose, viabilité des organes, éviter les possibles complications, perforation). Il n'existe à ce jour pas d'alternative au modèle animal adaptée pour ce projet. Les chirurgiens-gastroentérologues endoscopistes débutent leur apprentissage directement chez les patients. L'éducation sur modèle animal reste aujourd'hui la plus pertinente. Réduction : Le nombre d'animaux mis en œuvre est adapté précisément au nombre de participants inscrits à la formation. Chaque animal est utilisé au cours d'une séance par plusieurs participants sous la surveillance d'un expert. Nous accueillerons par formation au maximum 12 participants avec un maximum de 24 animaux utilisés par session. Le programme prévisionnel des formations sur 5 ans nécessitera un total de 825 animaux pour former plus de 1600 chirurgiens. Raffinement : Le protocole prévoit des procédures mini-invasives réalisées sous anesthésie générale, dont une majorité sans réveil des animaux en fin d'intervention.

Dans les cas de réveil où les animaux risqueraient des douleurs post-opératoires, un protocole de surveillance et de soins est mis en place. Il comprend une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs/anti-inflammatoires, un régime standardisé et un environnement enrichi. Des critères d'arrêt anticipés en cas de survenue d'une complication ont été définis

**8779** Ce projet a pour objectif de produire, à l'aide de souris, du sérum anti-toxine Pertussis (PT) nécessaire à la réalisation des tests de contrôle qualité. Ces tests permettent la mise sur le marché de lots de vaccins en vérifiant leur conformité aux normes de sécurité et d'activité.

Ces sérums (produits biologiques) ne peuvent pas, à ce jour, être produits sans le recours à l'animal de laboratoire. Les tests de contrôle qualité sont des tests *in vitro* réglementaires pour les vaccins commercialisés et ceux en développement.

Le sérum PT est un réactif critique du dosage de la toxine Pertussis par quantification (LUMINEX). Les anticorps antitoxine Pertussis (anticorps anti PT) sont produits chez des souris à partir d'anatoxine Pertussis purifiée adsorbée.

Ce projet conduira à l'utilisation d'un maximum de 104 souris sur une période de 2 ans.

Les protocoles encadrant la collecte de sang ou l'immunisation avec des antigènes n'entraînant pas de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées, des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une perte d'état général ou une maladie sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire.

A l'issue du projet, l'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être des Animaux.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les produits d'origine animale sont utilisés uniquement lorsque des produits fabriqués *in vitro* (anticorps monoclonaux) ne sont pas disponibles ou non adaptés à l'utilisation visée.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés dans des cages contenant des enrichissements, dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé. Pour la production d'anticorps, le protocole d'immunisation (calendrier et voie d'injection et antigène) a été choisi pour sa tolérance satisfaisante : réactions générales rares et réactions locales limitées. Autant que possible, les animaux sont transportés sur une courte distance et une courte durée (élevage de proximité). En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

**8780** La mise en place de cette certification repose sur une réflexion associée à la nécessité de l'obtention d'une habilitation reconnue par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (conformément à la réglementation (Décret 2013-118)) pour pouvoir travailler en tant que technicien pouvant appliquer des procédures en expérimentation animale.

L'acquisition d'une formation à l'expérimentation animale (anciennement nommée niveau 2) permettra d'obtenir l'autorisation de participer directement aux protocoles expérimentaux avec l'animal. En outre, cette formation permet aussi de sensibiliser à la protection et au respect des animaux de laboratoire en prenant en compte les composantes éthiques et réglementaires de l'expérimentation animale.

Cette formation hybride, enseignée en présentiel et à distance, a pour objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel impliqué dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant. Cette formation suit un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) et la demande a fait l'objet d'une validation en date du 2 novembre 2017.

Cette formation relative à la mise en place des procédures expérimentales sur petits rongeurs, comporte une approche théorique et pratique sur les modèles animaux rats et souris. Cette approche pratique ne pouvant pas être effectuée par le biais d'une méthode alternative, l'utilisation de ces modèles animaux est nécessaire.

Les enseignements théoriques portent sur les domaines suivants :

- réglementation et éthique animale
- modèle animal et méthodes alternatives
- bien-être animal, détresse, douleur
- procédures expérimentales et approche statistique, conception des procédures expérimentales
- anesthésie, analgésie et méthodes d'euthanasie
- santé animale, hygiène
- équipements et matériels d'animalerie.

Chaque session de formation (au maximum 2 fois par an) est ouverte à la formation continue et en formation initiale, pour un accueil de 28 stagiaires maximum. Le nombre d'animaux utilisé à chaque session sera d'un maximum de 14 rats et 14 souris réformées provenant de l'établissement éleveur fournisseur, soit un modèle animal pour 2 stagiaires. Sur 5 ans, un nombre total de 140 animaux sera utilisé par session de formation soit un maximum de 280 animaux étant donné que seulement 2 sessions peuvent être prévues par année. Dans le cadre de la règle des 3R, ce nombre a été réduit au maximum et selon les dates de formation, les souris pourront être utilisées dans le cadre des travaux pratiques de physiologie ou de pharmacologie. Les méthodes de raffinement sont mises en œuvre dans le cadre de l'hébergement (enrichissement du milieu avec des matières modifiables ou non). La visite tous les deux jours des animaux par du personnel compétent permet de suivre les bonnes conditions d'hébergement et le bon statut sanitaire et comportemental des animaux. Les méthodes utilisées en pratique ne sont pas invasives et permettent de diminuer au maximum le stress et la douleur des animaux. En outre, afin de limiter au maximum toute souffrance chez l'animal pas plus de deux gestes techniques sont effectués. Les gestes techniques sont les suivants : préhension, contention et administration de sérum physiologique par injection sous cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire ou administration d'eau par gavage gastrique.

## **8781** Objectifs du projet

Nos travaux visent à démontrer l'existence d'un lien entre neuro-inflammation et récepteurs olfactifs cérébraux et d'une implication de ces récepteurs dans l'inflammation, comme dans la maladie d'Alzheimer (MA), contre laquelle, il n'existe aucun traitement efficace. Une partie de notre projet porte sur l'impact d'une neuro-inflammation sur l'expression de récepteurs olfactifs cérébraux chez des souris co-exprimant un récepteur olfactif et la protéine fluorescente (GFP). Nous souhaitons induire une inflammation et mesurer les niveaux d'expression des gènes codant pour des récepteurs olfactifs et estimer leurs niveaux protéiques d'expression dans différents organes, et particulièrement le cerveau. En effet, une étude pilote nous a permis d'identifier des récepteurs olfactifs surexprimés dans des cerveaux de souris « Alzheimer ». Cette partie du projet devrait permettre de démontrer in vivo que les variations d'expression des récepteurs olfactifs sont liées à l'inflammation induite par la maladie.

Avantages/Dommages escomptés

L'inflammation sera faite par une seule injection de lipopolysaccharide (LPS). Ensuite, les animaux seront euthanasiés pour étudier les niveaux d'expression des gènes et des protéines « codant » pour les récepteurs olfactifs d'intérêts dans différents organes (cerveau, intestin, pancréas, cœur, poumon). Ces variations seront comparées à celles déjà obtenues avec les souris « Alzheimer » et à celles d'un modèle cellulaires d'expression, que nous développons en parallèle. Cette expérience est indispensable pour démontrer qu'il existe un lien entre processus inflammatoires et récepteurs olfactifs.

Nombre/types d'animaux

Trois souches de souris seront utilisées : MOR23, M71 et SR1. Elles co-expriment le récepteur olfactif et la GFP. Ainsi, il est possible d'analyser la densité du récepteur et de l'isoler pour analyser son expression. Nous prévoyons d'utiliser 20 souris de chaque souche, de 6 mois. Le nombre d'animaux est basé sur les publications, indiquant que 10 animaux par groupe (10 pour les analyses de biologie

moléculaire et 10 pour les analyses biochimiques, soit n=20 par groupe) sont nécessaires pour détecter des différences statistiquement significatives.

#### Remplacement

Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'animaux pour réaliser cette partie spécifique de notre projet et les autres méthodologies existantes ne se justifieront que lorsque la preuve, d'un lien entre inflammation et récepteurs olfactifs, sera établie in vivo. Les méthodes n'utilisant pas d'animaux livrent une quantité infime d'informations au regard de ce qui se passe dans un animal vivant entier. Notre projet vise à caractériser des molécules dans un contexte physiologique entier, permettant d'inclure un contexte physiopathologique et c'est pour cela que l'utilisation d'animaux est absolument indispensable et nécessaire.

#### Réduction

Le nombre de souris utilisées est réduit au minimum indispensable pour observer des différences statistiquement significatives malgré l'importante variabilité individuelle.

#### Raffinement

Nous nous assurons que toutes les mesures soient prises pour améliorer les procédures scientifiques et les conditions d'élevage, pour minimiser les souffrances, le stress et améliorer le bien-être des animaux. Le personnel est qualifié et assisté d'un vétérinaire permettant de gérer les animaux de façon appropriée : anesthésiques et analgésiques pour limiter les souffrances, habituation pour diminuer le stress, enrichissement (alvéoles à œufs) de l'environnement des animaux pour améliorer leur bien-être.

**8782** La maladie d'Alzheimer est une des formes de démence les plus répandues, affectant plus de 36 millions d'individus dans le monde. Pour la forme la plus fréquente de la maladie, que l'on appelle forme sporadique ou tardive, l'étiologie est actuellement inconnue. Les principaux traits neuropathologiques sont l'accumulation et l'agrégation de deux protéines : le peptide  $\beta$ -amyloïde sous la forme de plaques et la protéine Tau, sous la forme de dépôts neurofibrillaires. Une des hypothèses actuelles est qu'au cours de la maladie d'Alzheimer, le cerveau libère des quantités anormalement élevées de radicaux libres, notamment le monoxyde d'azote. Le monoxyde d'azote exerce normalement des fonctions neuromodulatrices et vasodilatatrices dans le cerveau sain, mais des concentrations excessives peuvent entraîner un stress oxydant et une neurotoxicité qui pourrait contribuer aux dysfonctionnements observés au cours de la maladie. Ainsi le cerveau de patients Alzheimer analysé post-mortem révèle des quantités anormalement élevées de nitric oxide synthase, l'enzyme qui permet la production de monoxyde d'azote. De plus, de nombreuses protéines sont nitrosylées de façon aberrante ce qui suggère qu'elles ont été modifiées chimiquement par des concentrations excessives de monoxyde d'azote. Cependant, l'hypothèse d'une libération accrue de monoxyde d'azote dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer n'a encore jamais été testée directement.

Pour tester directement cette hypothèse, il faudrait implanter des sondes dans le cerveau de patients, ce qui est impossible à l'heure actuelle. De plus, les techniques post-mortem consistant à étudier des explants de cerveau ne permettent pas d'obtenir des concentrations détectables de monoxyde d'azote. Ainsi, le recours à l'expérimentation animale apparaît indispensable à la compréhension du rôle de ce type de radicaux libres dans la maladie d'Alzheimer. L'expérimentation animale ne peut donc pas être remplacée par d'autres formes d'expérimentation in vitro ou ex vivo à ce stade.

Au cours de ce projet, nous utiliserons des souris APP/PS1-21, une lignée génétiquement modifiée pour produire des quantités élevées de la forme humaine du peptide  $\beta$ -amyloïde qui va s'agréger en plaques appelées plaques séniles comme celles observées chez les patients. Ces souris présentent des déficits cognitifs caractérisés par des troubles de la mémoire et de l'apprentissage, qui ne sont pas sans rappeler les symptômes des patients, mais qui sont suffisamment légers pour ne pas provoquer de souffrance chez l'animal. Des microélectrodes sensibles au monoxyde d'azote seront implantées dans le cerveau de ces animaux sous anesthésie générale et après traitement analgésique par un cocktail buprénorphine-lidocaïne-ropivacaïne. Nous évaluerons la concentration basale de monoxyde d'azote puis nous stimulerons la libération de monoxyde d'azote par trois types de stimuli : 1- stimulation électrique des neurones, 2-dépolarisation corticale et 3-administration de N-méthyl-D-Aspartate (NMDA), afin d'évaluer le fonctionnement de la voie de synthèse du monoxyde

d'azote. Ainsi, pour chaque condition, les concentrations de monoxyde d'azote libérées chez la souris sauvage seront comparées à celles libérées chez la souris mutante APP/PS1-21. L'expérimentation se terminera par l'euthanasie de l'animal. Notre protocole expérimental a été raffiné de manière à exclure toute forme de souffrance pour l'animal. Ce projet utilisera au total 180 animaux (90 souris dites « sauvages », 90 souris mutantes APP/PS1-21) sur une durée de 5 ans. Ce nombre est réduit au maximum tout en permettant la mise en œuvre de tests statistiques fiables. Il permettra de mieux comprendre le rôle du monoxyde d'azote dans la maladie d'Alzheimer et peut-être, de contribuer à développer de nouveaux traitements ciblés sur le stress oxydant dans cette pathologie.

**8783** Les formations réglementaires à l'expérimentation animale (niveau concepteur pour les chercheurs ; niveau applicateur pour les techniciens de laboratoire) sont approuvées par le Ministère de l'Agriculture (renouvellement obtenu pour 5 ans).

Ces formations ont comme objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel impliqué dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant.

Ainsi, ces formations suivent un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) avec des conférences (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de ce dossier, seules les séquences pédagogiques utilisant des rats (rattachés à l'animalerie centrale Rongeurs) sont décrites, à savoir :

- Séance de TP de maniement, contention, prélèvements et administrations
- Séance de TD-TP d'anesthésie

En fin de formation, nous recherchons, auprès de nos collègues scientifiques, si une opportunité se présente pour replacer les animaux dans un autre projet ou utiliser leurs cadavres à titre pédagogique, ou trouver une famille d'accueil pour adoption.

Le nombre de stagiaires par session de formation est variable d'une session à une autre et se trouve généralement de 15 à 25 (moyenne de 20 stagiaires). Les formations sont organisées 3 fois par an, ce qui correspond à un nombre total d'animaux utilisés sur 5 ans de 600 rats et 1200 souris.

Dans le cadre de la règle des 3R, il n'est pas possible de ne pas utiliser d'animaux pour former les futurs expérimentateurs, malgré le développement dans nos formations de méthodes alternatives sur mannequins d'animaux pour débiter les premiers actes de contention et d'administration. Le nombre d'animaux est réduit au minimum possible tout en permettant à chaque stagiaire de pouvoir s'exercer selon ses besoins de protocoles expérimentaux. En terme de raffinement, les actes légèrement invasifs réalisés sur animaux sont effectués après anesthésie générale afin de diminuer le stress et le risque de souffrance des animaux.

**8784** L'exposition de l'homme au bisphénol S (BPS), qui a remplacé le bisphénol A dans de nombreuses applications dont les emballages alimentaires et les papiers thermiques, n'est pas connue. Pour évaluer les quantités de BPS auxquelles l'homme est exposé, il est nécessaire de caractériser ses processus d'absorption orale et cutanée et ses modalités d'élimination par une approche pharmacocinétique. Cette approche requiert l'administration de BPS à la fois par voie intraveineuse et extravasculaire (transcutanée et orale) et la réalisation de prélèvements à un intervalle de temps régulier pour évaluer l'évolution au cours du temps des concentrations de BPS et de son principal métabolite, le BPS glucuronide (BPSG) dans le plasma, les urines et les fèces.

Etant donné que cette approche ne peut pas être mise en œuvre chez l'homme, nous utiliserons le porcelet au titre d'espèce animale pertinente pour l'homme en termes d'absorption transcutanée, buccale et digestive. L'intérêt de cette espèce est également l'importance de sa volémie qui autorise les prélèvements de sang, d'urine et de fèces répétés, ce qui permet de réduire le nombre d'individus dans le respect de la règle des 3R et d'accroître la précision des mesures, alors que les rongeurs ne peuvent être normalement prélevés qu'une seule fois. L'absorption orale et l'absorption transcutanée seront évaluées sur 2 lots respectifs de 6 porcelets pour documenter le devenir du BPS dans les différents compartiments d'absorption, de distribution et d'élimination et construire un modèle pharmacocinétique prédictif des concentrations en BPS dans les différents compartiments pour différents scénarios d'exposition. Les porcelets seront élevés dans des locaux adaptés dans des box entre les périodes de mesure et un enrichissement de leur cadre de vie sera obtenu à l'aide de ballons



et de balles suspendues. Lors des mesures qui nécessitent la collecte de l'ensemble des fèces et des urines émises, les porcelets seront placés dans des cages à métabolisme pendant 24 à 48h et garderont un contact visuel avec leurs congénères pour limiter l'impact de leur période d'isolement. De plus, les prélèvements d'urine et de fèces sont non invasifs et les prélèvements sanguins seront réalisés avec des aiguilles fines 22 G (0.7mm de diamètre, 38mm de longueur) de façon à réduire au minimum la douleur associée à la ponction.

**8785** Le développement constant des technologies de télécommunication a pour conséquence l'augmentation de l'exposition des populations aux champs électromagnétiques radiofréquences (CEM-RF). De nos jours, le téléphone mobile est devenu un outil de communication populaire (7,2 milliards d'abonnements aux téléphones mobiles dans le monde en 2015 selon l'Union Internationale des Télécommunications) et incontournable dans notre quotidien. Or, la proximité du téléphone mobile avec le cerveau des utilisateurs pose la question de la dangerosité de l'exposition aux CEM-RF générés lors de son utilisation. Les potentiels risques de l'exposition chronique aux CEM-RF pour la santé des individus constituent ainsi une question scientifique, ainsi qu'une problématique sociétale et économique majeure.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer les effets d'une exposition chronique à un niveau environnemental (en termes de débit d'absorption spécifique [DAS]) de CEM-RF générés lors de l'utilisation du téléphone portable GSM (« Global System for Mobile Communications », système de communication encore majoritairement utilisé et fonctionnant avec une fréquence de 900 MHz), sur l'activité comportementale et cérébrale, ainsi que la physiologie chez le rat.

Ce projet sera réalisé sur 36 rats mâles répartis en 3 groupes expérimentaux. Les animaux seront exposés au CEM-RF quotidiennement pendant 45 minutes, 5 jours par semaine durant 3 mois. Le choix de réaliser une exposition de 45 minutes par jour est basée sur la durée moyenne du temps passé pour un appel par les utilisateurs du téléphone portable (INTERPHONE group, 2010). Après 1 mois d'exposition et à la fin de la période d'exposition, ils seront testés au plan comportemental pour évaluer les effets de CEM-RF sur leurs performances cognitives (niveau d'activité et d'anxiété, et capacités de mémorisation). Les animaux seront ensuite euthanasiés. Des échantillons de sang et leurs cerveaux seront alors prélevés pour réaliser des analyses biochimiques, hématologiques, histologiques, immunohistochimiques, ainsi que des dommages à l'ADN.

Au plan de la réduction, les mêmes animaux seront dédiés à l'évaluation comportementale réalisée après 1 et 3 mois d'exposition au CEM-RF. Cette stratégie minimise le nombre de rats utilisés et permet de rendre de compte de manière pertinente de l'évolution des performances comportementales des animaux.

Concernant le raffinement, des enrichissements des conditions d'hébergement des animaux seront mis en place tout au long de l'étude pour assurer leur bien-être. Ils seront ainsi hébergés à 2 par cage pour leur socialisation. Des tubes, semblables à ceux utilisés pour l'exposition au CEM-RF, seront disposés dans les cages d'hébergement pour permettre aux animaux de se cacher, et également de s'habituer au dispositif d'exposition. Un fond sonore musical sera en outre diffusé durant la journée pour limiter le stress généré par les bruits environnementaux.

Pour ce qui est du remplacement, les études cliniques et les méthodes alternatives à l'expérimentation animale, de par leurs limitations éthiques et techniques, ne peuvent pas répondre au questionnement concernant les effets chroniques des CEM-RF sur l'ensemble des paramètres qui seront analysés, nécessitant de fait le recours aux études in vivo. En particulier, le rat sera utilisé pour les raisons suivantes :

- Il constitue un modèle de prédiction des effets toxiques chez l'homme reconnu par les grandes instances de réglementation internationales.

- Sa neurobiologie et sa physiologie ayant largement été étudiées et étant documentées de manière exhaustive, de nombreuses données de référence sont ainsi disponibles sur le rat.

- L'unité en charge du projet possède une expertise de plus d'une dizaine d'années en toxicologie expérimentale, ainsi que dans le domaine des effets des CEM, de la neurobiologie et de la biochimie. Elle dispose ainsi des compétences et de l'équipement nécessaire à l'exposition des rats aux CEM et à l'évaluation des effets tels que précités. Des études ayant déjà été réalisées au laboratoire sur cette espèce, les résultats de ce projet pourront y être confrontés et les compléter.

- Il permettra la confrontation des données de cette étude aux résultats des travaux antérieurs menés dans le domaine de l'évaluation des effets des champs électromagnétiques.
- L'ensemble des analyses ex vivo qui sont envisagées pourront être réalisées sur ce modèle animal.

#### **8786** Contexte scientifique et médical :

Le cerveau est un organe complexe : il contrôle des fonctions inconscientes, gère la motricité, est le siège de la conscience et des fonctions intellectuelles. Certaines pathologies du nourrisson et de l'enfant (hypoxie du nouveau-né, jaunisse, inflammation) peuvent provoquer des anomalies du développement cérébral responsables de séquelles motrices, intellectuelles, ou psychiatriques durables. En France, 5 enfants sur 1000 sont atteints d'une déficience neurologique sévère d'origine périnatale (entre le 8ème mois de grossesse et le 1er mois après la naissance). Il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique permettant de restaurer ces fonctions cérébrales ou de limiter les atteintes centrales.

Pour se développer et fonctionner correctement, le cerveau doit bénéficier d'un environnement parfaitement maîtrisé. Le cerveau est donc isolé du reste de l'organisme par des barrières cellulaires qui le protègent notamment des toxiques circulant dans le sang.

Au cours des pathologies périnatales, ces barrières peuvent être altérées : le cerveau est alors exposé directement aux toxiques sanguins ce qui participe à l'apparition de déficiences cérébrales chez l'enfant.

Récemment, nous avons identifié deux molécules pharmacologiques (utilisées en clinique chez l'homme) capable d'améliorer l'efficacité des barrières protectrices du cerveau au cours du développement périnatal chez le rat. Ces molécules pourraient agir via une voie métabolique appelée « Nrf2 ».

Objectifs du projet et bénéfices attendus :

Nous souhaiterions maintenant étudier l'implication de la voie Nrf2 dans l'action de ces molécules pharmacologiques neuroprotectrices.

Ce projet (5 ans) nous permettrait de formellement identifier la voie Nrf2 comme une cible thérapeutique intéressante pour améliorer l'efficacité des barrières protectrices du cerveau chez le nouveau-né en cas d'exposition à des composés toxiques (polluants environnementaux, médicaments...).

L'induction de la neuroprotection pourrait limiter ou prévenir les séquelles neurologiques causées par ces pathologies périnatales.

Espèce utilisé, modalités techniques :

Le mécanisme d'action de nos molécules pharmacologiques neuroprotectrices sera étudié chez le rat Nfe212em1Mcowi génétiquement invalidé pour la voie Nrf2 (fond génétique Sprague Dawley), qui ne présente pas de phénotype dommageable. Des animaux de 2 jours seront anesthésiés puis traités par injection intrapéritonéale avec les molécules pharmacologiques neuroprotectrices que nous avons identifiées.

L'efficacité de ces deux molécules à améliorer l'efficacité des barrières protégeant le cerveau, ou à restaurer leurs propriétés neuroprotectrices lors d'une infection bactérienne légère au stade périnatal sera également évaluée sur des animaux Nfe212em1Mcowi de 2 jours. L'infection bactérienne sera modélisée par injection intrapéritonéale sous anesthésie d'un composant de paroi bactérienne (Pam) qui induit une inflammation similaire à celle produite au cours de l'infection. Aux doses utilisées, le Pam entraîne une légère inflammation chez le rat Sprague Dawley, qui n'est pas associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Les différents prélèvements (tissus, sang, liquide céphalorachidien) nécessaires à l'étude des barrières protectrices du cerveau seront réalisés après euthanasie de l'animal.

Conformité à la règle de 3R :

Remplacement :

- Il n'existe pas de modèles cellulaires des interfaces sang-cerveau spécifiques de différents stades de développement. Il n'est donc actuellement pas possible de modéliser ces interfaces au stade périnatal in vitro ou in silico.

- La voie d'administration optimale de chaque molécule utilisée pour étudier l'intégrité des barrières protectrices du cerveau est prédéfinie par des tests in vitro et par les caractéristiques structurale et métabolique de la molécule.

Réduction :

- 84 rats Nfe212em1Mcwi seront utilisés.

- Une étude précédente (réalisée à 3 stades de développement, sur des animaux Sprague Dawley) nous a permis de sélectionner un seul stade de développement d'intérêt, ce qui réduit le nombre d'animaux.

- Cette étude nous a également permis d'ajuster précisément le nombre d'animaux nécessaire dans chaque groupe pour pouvoir réaliser des tests statistiques pertinents.

- Nous limiterons le nombre d'animaux en réalisant les expérimentations sur des animaux issus d'une même portée lors de comparaisons de groupes afin de limiter les variations interindividuelles (« litter-based method »).

Raffinement :

- Nous veillerons à limiter le mal-être des animaux : les femelles avec leurs portées seront placées dans des cages transparentes à environnement enrichi (papier, coton, carton) avec un accès permanent à l'eau et à la nourriture (cycle jour/nuit de 12h, température contrôlée).

- Toutes les injections intrapéritonéales seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Le réveil des animaux sera réalisé dans une boîte de réveil enrichie en O<sub>2</sub>, à 37°C. Les animaux auront un suivi clinique très rapproché dans les heures qui suivront la réintroduction avec leur mère.

- Des critères d'arrêt ont été identifiés pour éviter la souffrance d'un animal.

**8787**

Les vaisseaux sanguins et l'angiogenèse tumorale sont généralement associés à la croissance tumorale et aux résultats cliniques médiocres des patients cancéreux. Cependant, nous avons constaté que certains vaisseaux sanguins présents dans le microenvironnement tumoral peuvent être associés à un pronostic favorable en contribuant à la suppression tumorale plutôt qu'à la croissance tumorale. Ces vaisseaux sanguins spécialisés, appelés Veinules Endothéliales Hautes (HEV), se trouvent normalement dans les nœuds lymphatiques, où ils interviennent dans l'entrée des lymphocytes du sang vers les tissus lymphoïdes. Une forte densité de HEV de tumeurs dans les carcinomes mammaires humains a été associée à des niveaux élevés d'infiltration de lymphocytes cytotoxiques, indiquant que les HEVs peuvent participer à l'éradication des tumeurs en facilitant l'accès des lymphocytes « Tueurs » au sein des tissus tumoraux. Le projet a donc pour objectif de mieux définir les mécanismes moléculaires et les cellules impliquées dans la régulation des HEV ainsi que leur contribution à l'immunothérapie contre le cancer.

Le projet, avec ses différentes étapes, nécessite l'utilisation de 2052 souris sur 5 années soit environ 410 souris par an.

3R : Réduire : « Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Le partage d'organes ou de tissus pourra se faire entre les différentes parties du projet pour réduire encore l'effectif. Le nombre d'animaux donné est fixé sur le maximum nécessaire. En effet, si les premières parties du projet se révèlent négatives, le nombre pourrait être réduit.

Raffiner : « Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommage durables que pourraient subir les animaux. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie volatile pour réduire l'angoisse des animaux. Le suivi des animaux après chaque procédure sera journalier (masse tumorale, poids de l'animal, aspect extérieur) avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint.

Remplacer : « Les cellules des vaisseaux HEV sont remarquablement plastiques et perdent rapidement leurs caractéristiques spécialisées en dehors de leur tissu d'origine. L'étude des vaisseaux HEV dans les tumeurs doit donc être réalisée in vivo, en utilisant des modèles animaux. Les procédures expérimentales in vivo aujourd'hui ne peuvent donc pas être remplacées par des méthodes expérimentales in vitro n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Cependant les recherches menées dans le cadre de ce projet apporteront des connaissances moléculaires nécessaires au développement futur de modèles de cultures cellulaires pour des études in vitro »

Les modèles de tumeur pertinents qui ont été identifiés sont des modèles murins. De plus, l'existence de souris transgéniques déficientes en certaines populations immunitaires ou permettant l'élimination in vivo de populations immunitaires spécifiques, permettra de déterminer le rôle de ces différentes populations dans le développement et la fonction des vaisseaux HEV de tumeur. Seule l'espèce murine offre ces modèles transgéniques.

**8788** Les avancées en matière d'imagerie médicale permettent aujourd'hui de mieux imager les organes, tel le foie, ou de détecter des pathologies. Dans le cadre de ce projet, plusieurs types de sondes d'imagerie fluorescentes permettant de visualiser les cellules saines du foie, ou de détecter la présence de tumeurs, ont été développées in vitro. L'objectif de ce projet est d'utiliser une technique d'imagerie optique non invasive in vivo dans un double but : 1) suivre la croissance de cellules tumorales, rendues luminescentes, implantées en sous cutanée ou dans le foie de souris ; 2) déterminer la cinétique de distribution de sondes d'imagerie fluorescentes spécifiques, préalablement injectées aux souris par voie intraveineuse.

Dans ce contexte, la souris est le meilleur modèle animal permettant d'atteindre nos objectifs. Nous utiliserons trois types de modèles : la souris saine, pour évaluer des agents ciblant les cellules saines du foie, la souris implantée de tumeurs en sous-cutanée, pour évaluer les agents d'imagerie ciblant la tumeur, et la souris implantée d'une tumeur en intrahépatique, permettant d'évaluer les sondes d'imagerie ciblant les différentes zones du foie saines et pathologiques.

Pour que la souffrance des souris soit réduite au maximum, les procédures de chirurgie et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence ainsi que son comportement sont révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

Des études préalables ont permis de sélectionner les sondes les plus efficaces, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. De plus, nous utiliserons l'imagerie optique pour évaluer le profil de distribution en fonction du temps, réduisant ainsi à son minimum le nombre d'animaux utilisés. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 290 souris.

Ainsi, grâce à ces études de biodistribution nous pourrions identifier des nouvelles sondes d'imagerie à visée diagnostique ciblant les cellules saines du foie ou les cellules cancéreuses.

**8789** Notre projet vise à développer un modèle mathématique prédisant, chez la souris en régime gras, le stockage des lipides dans les différents tissus de l'animal et ce, en se basant sur les valeurs globales de mesure non invasive de la composition corporelle par RMN (système EchoMRI). D'autres paramètres physiologiques seront obtenus de manière rapide et non invasive, tels que la quantité de triglycérides et d'acides gras libres dans le sang, la glycémie, l'insulinémie, etc. Pour générer cet outil mathématique, le modèle animal est nécessaire afin de récupérer les paramètres précités.

Dans le cadre des études sur le diabète de type II, le cancer du foie et les atteintes pancréatiques ou rénales liées à la lipotoxicité par exemple, un tel modèle mathématique permettrait aux chercheurs de choisir la durée de régime idéale pour obtenir une atteinte tissulaire en adéquation avec leur hypothèse de travail. In fine, ceci permettrait de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaire au bon déroulement des projets de recherche. L'étude nécessitera au total 248 animaux. Les souris devenant obèses après quelques semaines de régime gras, elles seront hébergées par cages de 3 individus au lieu de 4 ou 5. La seule lignée de souris utilisée dans cette étude est la lignée C57Bl/6J, classiquement utilisée dans les études du métabolisme, dont les mâles répondent très bien au régime gras. Les animaux seront observés 3 fois par semaine et pesés toutes les deux semaines afin de repérer des anomalies, notamment en terme de comportement général, de poids ou d'apparence. Les seules souffrances qui pourraient arriver lors de ce projet seraient dues à l'éventuelle agressivité des mâles entre eux. En cas de blessure, les animaux seront soit séparés et leurs blessures traitées à la Bétadine pour favoriser une cicatrisation propre, soit euthanasiés (en fonction des blessures, sur avis du responsable du Bien être animal de la zootechnie). Notre projet vise à générer un outil pour les chercheurs qui travaillent sur la souris d'où l'utilisation de ce modèle qui est bien caractérisés d'un point de vue métabolique. Nous voulons participer, avec ce modèle

prédictif du stockage ectopique des lipides, à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans le cadre des études sur le métabolisme.

**8790** Le pancréas joue un rôle clef dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant respectivement les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique). L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose (ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines. Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 et 2, deux maladies résultant in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Spécifiquement, notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Nous avons ainsi identifié un gène d'intérêt et avons généré des animaux pour lesquels ce gène est spécifiquement inactivé dans le pancréas (brevet en cours). Ces animaux ne deviennent jamais diabétiques lorsque soumis à différents traitements normalement résultants en un diabète. Il semblerait que ces animaux absorbent moins les sucres que des animaux normaux. Nous souhaiterions le vérifier par des analyses métaboliques. Ces animaux sont déjà dans l'animalerie voisine afin d'effectuer ces analyses (nous ne sommes pas équipés dans notre animalerie).

Nous prévoyons d'utiliser 60 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé in vitro.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et cela sans prévoir de répétition des expériences.

Raffinement : Aucun des animaux utilisés dans ce projet ne présente de phénotype dommageable. Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. En amont de la procédure, des dispositions (habituation) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux.

**8791** La vaccination est l'une des avancées majeures de la médecine moderne. Elle a permis de réduire grandement la prévalence de nombreuses maladies telles que la variole et le maintien d'une bonne couverture vaccinale est indispensable pour éviter la résurgence de ces maladies infectieuses.

Bien que l'utilité de la vaccination ait été amplement démontrée, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années, liée à certains événements, comme par exemple les crises sanitaires (Médiator, sang contaminé, etc.), les soupçons de collusion entre autorités de santé et industrie du médicament sous l'effet de scandales médiatisés et la question des adjuvants dans les vaccins.

L'aluminium (alum) est utilisé pour ses propriétés d'adjuvant vaccinal depuis 1927. Il demeure l'adjuvant le plus utilisé, mais les mécanismes par lesquels il stimule la réponse immunitaire sont

encore largement incompris. Généralement bien toléré, l'alum pourrait cependant être à l'origine de troubles chroniques occasionnels chez des sujets prédisposés. En effet, de rares sujets vaccinés présentent des douleurs musculaires retardées et diffuses, un état d'épuisement chronique et des troubles cognitifs invalidants. Ces symptômes, associés à la présence d'un bouton inflammatoire chargé en particules d'aluminium au niveau du site d'une immunisation préalable avec un vaccin adjuvanté en hydroxyde d'aluminium, permettent de diagnostiquer une condition pathologique décrite au laboratoire comme la Myofasciite à Macrophages (MFM).

Des études antérieures réalisées chez la souris indiquent que l'adjuvant injecté dans le muscle est en partie transporté à distance, d'abord vers les ganglions lymphatiques de drainage puis, via le canal thoracique, vers la circulation sanguine, avec une accumulation retardée et progressive dans le cerveau. Quoique constante, la pénétration cérébrale reste extrêmement faible en conditions normales, ce qui est cohérent avec la bonne tolérance générale à cet adjuvant malgré son fort potentiel neurotoxique.

Chez les patients MFM, des mutations génétiques ponctuelles touchant un mécanisme de détoxification cellulaire (l'autophagie) qui entre en jeu dans l'élimination de l'alum suite à une vaccination ont été mises en avant. Le présent projet repose sur l'hypothèse qu'un défaut dans le mécanisme autophagique permettrait un transport plus important de l'alum vaccinal jusqu'au cerveau, où il induirait un effet neurotoxique conduisant aux troubles observés chez les patients MFM. Notre but est de comprendre l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de transport de l'alum vaccinal depuis le muscle injecté jusqu'au cerveau et l'effet de l'accumulation cérébrale de l'alum par une étude comportementale réalisée chez la souris, afin de mettre en avant d'éventuels troubles cognitifs communs avec les patients MFM.

Cette étude sera réalisée sur 760 souriceaux C57BL/6J nés à l'animalerie et issus de 114 animaux reproducteurs achetés auprès du laboratoire Janvier pour un total de 874 animaux. La pertinence de cette étude est justifiée par le souhait de l'Académie Nationale de Pharmacie d'étudier les effets et l'innocuité des vaccins spécialement chez le jeune plus sensible et soumis à un programme vaccinal dense.

En effet des différences de réponses sont attendues par comparaison avec les adultes suite à une exposition à des particules d'aluminium d'une part, et à une stimulation du système immunitaire d'autre part, en accord avec l'immaturation des jeunes souris, exposées avant la fin de la maturation de leur système nerveux central et de leur système immunitaire, durant la période dite de vulnérabilité.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la distribution systémique d'un agent pharmacologique ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude *in vitro*. La souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant la variabilité interindividuelle. Le nombre d'animaux permet d'obtenir un effectif minimal analysable d'individus par groupe, date et sexe en tenant compte de la perte possible et involontaire de certains individus sans compromettre l'analyse statistique des résultats ni risquer l'euthanasie inutile d'un grand nombre d'animaux. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

**8792** La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des maladies neurodégénératives. Elle est caractérisée par une évolution lente mais progressive de l'atteinte neuronale affectant les capacités de mémorisation et cognitives des patients réduisant progressivement leur autonomie. Cette pathologie complexe est liée à un dysfonctionnement des connections entre neurones (synapses) qui aboutit à la dégénérescence des neurones de l'hippocampe puis de l'ensemble du cerveau. Les patients doivent endurer une perte irréversible de leurs fonctions cognitives puisqu'à l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de stopper l'évolution de la pathologie. La compréhension des mécanismes mis

en œuvre précocement et conduisant à cette neurodégénérescence représente donc un défi majeur afin de développer des thérapeutiques innovantes.

Avant même l'apparition des premiers symptômes, les neurones sont affectés par des dysfonctionnements liés à la présence de protéines anormales. Parmi ces protéines, on trouve le peptide bêta-amyloïde dont l'accumulation conduit à la formation de plaques amyloïdes ou plaques séniles. Ces protéines sont présentes très tôt dans le cerveau, dès les stades asymptomatiques, c'est à dire bien avant la dégénérescence des neurones. Ce sont ces stades qui nous intéressent et notre objectif est de comprendre quels sont les mécanismes à l'origine de la toxicité du peptide bêta-amyloïde et de la mort neuronale. Pour cela, nous étudions le fonctionnement des synapses et nous nous intéressons notamment à un partenaire essentiel de la synapse : l'astrocyte. En effet, l'astrocyte envoie des prolongements au cœur de la synapse et il participe activement à maintenir la structure de la synapse tout en modulant la communication entre les neurones. Ce garant structurel et fonctionnel de l'intégrité des synapses semble jouer un rôle de première ligne dans la protection mais également dans la mise en place des phénomènes de toxicité synaptique.

L'objectif de notre projet est d'étudier l'impact de la présence du peptide bêta-amyloïde sur le fonctionnement de l'astrocyte et les conséquences de cet impact sur les synapses qu'il entoure au sein de l'hippocampe de souris. Cette structure est essentielle dans la mémorisation et est la première affectée par les dysfonctions liées à la présence du peptide bêta-amyloïde. Nous étudierons à la fois l'activité neuronale et l'activité astrocytaire dans ces régions et chercherons à mettre en évidence l'influence du peptide bêta-amyloïde sur cette communication ainsi que les conséquences bénéfiques et/ou délétères du partenaire astrocytaire dans les stades précoces et asymptomatiques de la maladie.

La procédure expérimentale que nous développons dans ce projet vise à injecter des constructions virales via des injections intraveineuses. Les virus utilisés sont des adénovirus modifiés qui passent la barrière hématoencéphalique et ne nécessitent pas d'injections stéréotaxiques intracérébrales invasives. Nous utiliserons 4 constructions virales qui permettront d'étudier la plasticité morphologique et fonctionnelle des astrocytes dans un milieu intégré et préservé. Ces constructions ne modifient pas le phénotype et ne sont pas dommageables pour l'animal.

Remplacement - Notre approche méthodologique est basée sur l'enregistrement simultané de l'activité électrique neuronale et l'activité calcique astrocytaire sur des tranches aigues d'hippocampe de cerveau de souris. La combinaison de ces techniques nous permet d'avoir accès aux interactions neurones-astrocytes dans un environnement physiologique préservé qui maintient l'intégrité fonctionnelle des réseaux hippocampaux et l'intégrité des communications cellulaires au sein de ces réseaux. Ce modèle ne peut être remplacé par des modèles de culture cellulaire in vitro car les interactions neurones-astrocytes sont limitées en culture et les fonctions astrocytaires sont restreintes à un soutien métabolique qui ne reflète pas la complexité de leurs fonctions in vivo. Dans ce contexte, la souris apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité moléculaire, cellulaire et fonctionnelle des circuits impliqués dans les processus mnésiques. Ce choix du modèle souris est également justifié par le fait que nous utiliserons des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer. Ces souris transgéniques développent des plaques amyloïdes au niveau du cerveau et manifestent les mêmes troubles mnésiques et cognitifs que l'homme en vieillissant.

Raffinement - Cette procédure d'injection intraveineuse de virus est beaucoup moins douloureuse, invasive et coûteuse qu'une injection stéréotaxique intracérébrale. Elle ne nécessite aucune chirurgie et n'induit pas de lésion locale ce qui est crucial lorsqu'on étudie les fonctions physiologiques astrocytaires. Nous serons particulièrement attentifs au bien-être animal afin de minimiser la douleur ou l'angoisse des animaux. Nous surveillerons les animaux jusqu'à leur réveil complet et les heures suivant l'anesthésie.

Réduction - Cette procédure nécessite un nombre restreint d'animaux car elle est plus fiable en terme de délivrance et plus reproductible que les injections stéréotaxiques intracérébrales. Nous testerons 4 constructions virales sur 4 lots d'animaux et à 2 âges différents ce qui concerne au total 256 animaux sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant la validité statistique des résultats obtenus.

**8793** La pathologie coronarienne est une cause majeure de morbi-mortalité dans le monde, motivant le développement de nouvelles solutions thérapeutiques. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ce type de pathologie est essentielle à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réparer les artères coronaires.

Chez l'adulte, nos travaux antérieurs ont montré que la protéine d'intérêt était exprimée dans la néovascularisation après hypoxie ou un infarctus du myocarde (IDM). Compte tenu de la mortalité embryonnaire des souris knockout pour cette protéine, nous avons développé plusieurs modèles de lignées de souris déjà existants dans notre laboratoire qui permettent de répondre aux 3 objectifs définis. Ces objectifs correspondent à :

i) l'étude chronologique de l'importance de la protéine pour la fonction et la formation de vaisseaux après l'IDM,

ii) la caractérisation des types cellulaires qui expriment la protéine et qui sont impliqués dans la formation de vaisseaux cardiaques,

iii) l'identification des gènes induits par la protéine après un IDM.

Nous envisageons de décrire la chronologie de l'activation de la protéine et les types cellulaires impliqués dans cette signalisation après un IDM chez la souris adulte, résultant d'une ligature permanente de l'artère coronaire descendante gauche (LAD) par voie chirurgicale. C'est l'un des modèles les plus couramment utilisés pour mimer l'infarctus du myocarde chez l'homme. Cela permettra donc de comparer avec d'autres études sur l'infarctus. Nous réaliserons cette étude grâce à des modèles génétiques permettant le traçage des cellules activées.

En effet, l'homéostasie et le remodelage cardiaque sont des processus complexes. Le remodelage vasculaire après un infarctus aide le myocarde à survivre. Bien qu'il existe des modèles in vitro, l'interaction entre différentes populations cellulaires ne peut pas être mimée par une approche in vitro. Après avoir déclenché un infarctus, il est important de suivre le cœur dans son environnement. En outre, les lignées transgéniques utilisées nous permettent d'observer, après l'infarctus, l'activation de voies de signalisation et d'identifier des cellules impliquées. L'emploi d'un modèle animal comme la souris récapitulant la physiopathologie du cœur chez le mammifère est donc essentiel.

L'ensemble de ces résultats devrait nous permettre d'établir si le contrôle de la voie de signalisation par la protéine peut contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques chez l'homme pour la prise en charge de l'IDM. Nous prévoyons d'utiliser 320 souris pour l'ensemble de ces travaux. Nous réduirons ce nombre à chaque fois que cela sera possible par la standardisation du modèle d'infarctus.

Notre stratégie est conçue pour une prise en compte des objectifs de remplacement, raffinement, et réduction.

Concernant le remplacement, nous avons validé toutes les analyses moléculaires dans des systèmes de culture cellulaire ou de façon purement biochimiques.

Dans le sens du raffinement, l'anesthésie et l'analgésie seront utilisées comme premières méthodes pour limiter autant que possible la souffrance potentielle des animaux. Des points limites précoces et adaptés seront évalués quotidiennement

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études échocardiographiques et la réalisation des analyses histologiques et moléculaires. Ce projet utilisera au maximum 320 souris adultes.

**8794** L'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un produit (médicament, agent de contraste...) nécessite au préalable de caractériser notamment sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamique. La pharmacocinétique consiste à évaluer l'absorption, la diffusion, la métabolisation et l'excrétion du produit par l'organisme. Elle permet notamment d'améliorer les dosages et la posologie du produit par l'étude de sa concentration sanguine au cours du temps. Elle permet également de déterminer les voies d'administrations optimales selon la métabolisation du produit dans l'organisme. La pharmacodynamique consiste quant à elle à évaluer les effets du produit sur l'organisme. Ce projet a pour objectif de caractériser la pharmacocinétique et la pharmacodynamique après administration de produits chez le cobaye et le rat.



Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'évolution et les effets d'un produit dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Le recours à l'imagerie médicale (imagerie à rayons X ou imagerie optique) dans ce projet permet de suivre au cours du temps la distribution de produits radio-opaques ou rendus fluorescents de manière quantitative et spatiale. Cette méthode d'analyse présente l'avantage d'être non invasive, nécessitant seulement une anesthésie générale. Elle permet également de suivre un même animal au cours du temps et donc de diminuer l'impact de la variabilité individuelle sur les résultats et de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

En fonction des espèces, un nombre différent d'animaux par groupe et par étude sera prévu :

- Cobaye : 300 cobayes au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 30 cobayes par étude soit à 3 groupes de 10 cobayes et 10 études au cours des 5 années.

- Rat : 500 rats au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 50 rats par étude soit à 5 groupes de 10 rats et 10 études au cours des 5 années.

Les groupes, le nombre d'animaux et d'études pourront varier pour chaque espèce, mais le nombre total d'animaux prévus dans ce projet ne pourra pas être supérieur à la prévision annoncée.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en cage (ou en enclos pour les cobayes) pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social.

Des points limites ont été définis afin de préserver le bien-être des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et des soins seront apportés aux animaux lorsque nécessaire (désinfections des plaies, réchauffement, réhydratation, etc).

**8795** Notre laboratoire de recherche fondamentale étudie une classe de molécules trouvée dans toutes les cellules vivantes : les longs ARN non-codant (lncARN). Les cellules humaines produisent plus de 10.000 lncRNA différents. Ces molécules ont été jusqu'à récemment très peu étudiées, et pour la plupart, leur fonction reste inconnue. Cependant, la dérégulation de nombres d'entre elles a été associée à différents cancers. Certains lncARN présentent même un fort potentiel comme cibles thérapeutiques ou marqueurs des différents stades de progression de ces maladies. Cependant, leur mécanisme d'action est encore non-élucidé.

Parmi ces lncARN, plusieurs sont dérégulés chez les patients souffrant de mélanome. Le mélanome est le cancer de la peau qui connaît la plus forte progression en France, avec plus de 10.000 nouveaux cas chaque année. Il est également le plus meurtrier, avec plus de 1.500 décès par an.

Le présent projet vise à étudier 5 gènes de lncARN impliqués dans le mélanome et de déterminer s'ils ont un rôle oncogénique ou anti-tumoral sur le développement et la progression de la maladie.

Pour cela, nous utilisons le poisson zèbre, un vertébré inférieur largement étudié pour son développement, qui apparaît comme un modèle de choix pour étudier cette pathologie. En effet, la formation des mélanocytes et le développement du mélanome chez le poisson zèbre sont particulièrement similaires aux processus humains. En combinant des lignées de poissons zèbres mutantes pour des longs ARN non codants déjà existantes, avec des modèles de mélanome humain, nous pourrions évaluer l'importance de nos candidats. En effet, nous comparerons l'évolution de la maladie dans un contexte génétique contrôle, où les gènes cibles sont exprimés, à un contexte génétique modifié, où un gène cible n'est plus exprimé.

La transparence des poissons zèbre nous permettra également de suivre le processus métastatique in vivo, à l'échelle de l'organisme entier.

Ce projet est divisé en trois étapes, la première permettra d'évaluer l'impact de l'absence des lncARN sur la progression du mélanome. Cette première étape nécessitera l'utilisation de 1200 individus.

Selon les résultats obtenus pour chaque gène, nous poursuivrons avec la seconde procédure qui étudiera le processus métastatique : nous évaluerons la capacité des cellules cancéreuses à envahir l'organisme chez la larve de poisson zèbre (au maximum 960 individus).

La troisième étape du projet consistera en la création de lignées développant le mélanome dans un contexte génétique pure afin d'identifier le rôle de nos gènes cibles au niveau moléculaire (un maximum de 1800 individus).

Ce projet pourrait donc permettre d'identifier des lncARN comme nouvelles cibles moléculaires aux différents stades de la maladie. A terme, ces connaissances pourront conduire à une meilleure compréhension de cette pathologie et ouvrir de nouvelles options thérapeutiques.

Nous aurons soin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Il n'existe en effet pas de modèle ex-vivo permettant de suivre le processus métastatique au sein d'un organisme entier. Nous utilisons donc le poisson zèbre, un modèle vertébré inférieur, comme méthode alternative des modèles murins. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous nous limiterons aux besoins statistiques de nos analyses. De plus, la réalisation des procédures 2 et 3 dépend des résultats obtenus pour chaque lncARN candidat lors de la procédure 1. Nous utiliserons au maximum 3960 poissons zèbres pour ce projet. Enfin, pour le critère du raffinement, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des individus, et ce, en accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie. Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Aucun analgésique n'est actuellement décrit en utilisation sur les poissons zèbre c'est pourquoi si un signe de mal-être est remarqué, l'étude sera interrompue pour l'individu concerné. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux.

**8796** Ce projet est un projet de recherche fondamentale dans le domaine de la santé publique. Les maladies cardiovasculaires sont encore un problème de santé publique et les perspectives ne sont pas encourageantes du fait de l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, notamment du diabète. Notre projet est de montrer chez la souris que le déséquilibre dans la balance protéases-antiprotéases est une source de développement des plaques d'athérosclérose et donc d'infarctus du myocarde. Dans notre hypothèse, le rôle d'une antiprotéase, la serpine E2 est essentiel. Pour cette démonstration, le projet s'articule autour de deux parties. La première partie cherche à démontrer que la serpine E2 peut effectivement ralentir le développement de la plaque. Dans la deuxième partie, nous chercherons à définir le type cellulaire impliqué dans ce rôle protecteur de la serpine E2. Pour chacune de ces parties, nous examinerons par immunohistochimie les caractéristiques des plaques athéromateuses chez chacune des lignées de souris utilisées. La pathologie athéromateuse est une maladie complexe, plurifactorielle qui n'est reproductible ni in vitro ni in silico : seule une expérimentation in vivo peut permettre son exploration et de délivrer des informations. De plus, nous utilisons des souris car notre étude impose l'analyse de plaques d'athérosclérose à différents temps qui ne peuvent être obtenues que chez l'animal vivant. Nous utiliserons 448 souris, nombre qui a été déterminé de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Nous étudierons deux lignées de souris hypercholestérolémiques qui développent des lésions d'athérosclérose spontanément ou sous régime spécial, les ApoE<sup>-/-</sup> et LDLR<sup>-/-</sup>. Les procédures ne comportent pas de gestes chirurgicaux. Le développement de la pathologie athéromateuse est induit par un régime riche en cholestérol et n'induit pas de souffrance chez l'animal. L'arrêt de l'expérimentation est lié à une cinétique dépendant du temps de développement de chaque étape connue de la plaque athéromateuse. Afin de respecter le principe de raffinement, les animaux seront observés tous les jours par les membres qualifiés de l'animalerie et tout comportement anormal sera directement communiqué à la personne responsable du projet. De plus, les animaux seront observés régulièrement (au moins 1 fois par semaine) par les expérimentateurs confirmés responsables du projet connaissant bien les modèles utilisés. Enfin, les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. L'avantage attendu de ce projet est la définition du rôle des antiprotéases, telle que la serpine E2, dans l'athérosclérose et donc dans l'infarctus du myocarde.

**8797** Notre projet a pour but de mieux caractériser et comprendre le rôle de certaines cellules immunitaires, les neutrophiles, dans le développement des crises douloureuses, appelées crises vaso-occlusives, chez les patients atteints de drépanocytose. La drépanocytose est la maladie génétique du sang la plus fréquente au monde. Cette maladie se manifeste par une déformation et une rigidification des globules rouges dans certaines conditions comme le froid, l'hypoxie, l'effort ou l'infection. Ces globules rouges déformés et plus fragiles sont source d'une anémie et de crises vaso-occlusives liées à l'interruption du flux sanguin. Ces crises touchent le plus fréquemment l'os, source de crises

extrêmement douloureuses, mais sont les plus graves lorsqu'elles touchent le thorax ou le cerveau. La répétition de ces ischémies induit des lésions dans tous les organes et donc une réduction de l'espérance de vie. Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier le rôle des neutrophiles et le rôle de la voie de l'endothéline, dans le développement des crises vaso-occlusives de la drépanocytose. Nous cherchons ainsi à valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro.

En premier lieu, nous utiliserons 2 modèles de souris génétiquement modifiées drépanocytaires et un modèle de souris drépanocytaire ayant une autre mutation génétique pour étudier le rôle des neutrophiles et le rôle de la voie de l'endothéline dans les neutrophiles au cours des crises vaso-occlusives de la drépanocytose. Afin de déclencher ces crises, les souris seront soumises à une hypoxie pendant une heure avant d'être euthanasiées pour analyser les lésions tissulaires et les cellules immunitaires. Pour certains groupes de souris un traitement pharmacologique sera appliqué afin d'étudier son effet potentiellement protecteur sur les crises. Enfin, pour étudier les mécanismes d'interactions entre les cellules immunitaires et les vaisseaux sanguins, certaines souris drépanocytaires seront étudiées en microscopie intravitale, une technique unique permettant de visualiser directement les cellules dans l'animal anesthésié.

La drépanocytose est une maladie complexe, multifactorielle et seule l'expérimentation in vivo, permettant l'étude des cellules immunitaires dans leurs environnements vasculaire et tissulaire, permettra de comprendre le rôle des neutrophiles dans le développement des crises vaso-occlusives et pourrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques innovantes.

Pour respecter le principe des 3R, les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisant. Certains paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire, et les protocoles d'acquisition en imagerie ont déjà été déterminés par d'autres projets et permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés. D'autres études concernant l'adhérence des neutrophiles dans un milieu vasculaire ont déjà été réalisées in vitro. Nous nous attachons à réduire au maximum la souffrance des souris. Certaines expériences comme l'épreuve hypoxique ne présente pas d'approches substitutives ; nous évaluerons continuellement l'état général de l'animal, son apparence et son comportement, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Cette étude prévue sur 5 ans nécessitera au total 1122 souris.

À terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation de l'adhérence pathologique des neutrophiles aux vaisseaux dans la drépanocytose. Ils pourraient faire émerger de nouvelles pistes thérapeutiques innovantes et nécessaires pour les patients atteints de cette maladie.

**8798** Les animaux élevés dans des structures spécifiques scientifiques reçoivent toujours les mêmes aliments pour éviter toute interférence avec les résultats scientifiques. L'aliment actuellement utilisé est constitué de protéines animales et représente un budget relativement conséquent. Nous désirons recourir à un aliment 100 % végétal qui possède un coût inférieur. Pour cela, il faut vérifier que ce nouvel aliment ne changera pas les résultats scientifiques déjà obtenus par les équipes de recherche. Dans ce projet nous utiliserons les deux types d'aliment en parallèle. Nous utiliserons des souris âgées de 4 semaines, dont le poids sera d'environ 13 g à l'arrivée dans les locaux d'hébergement. Les animaux seront hébergés dans une structure répondant aux exigences légales et ayant obtenue l'agrément. Un enrichissement sera apporté dans chacune des cages (feuilles essuie-tout). Des tubes ou igloos seront ajoutés en cas d'agressivité observée entre les animaux d'une cage, ne nécessitant tout de même pas l'isolement du dominant (l'igloo est l'étape précédent l'isolement). Si la présence d'un igloo ne ramène pas le calme dans la cage, le dominant sera isolé. La nourriture et la boisson seront mises à disposition à volonté. Un technicien de la structure passera tous les jours (week-end et jours fériés inclus) pour vérifier les souris, les mangeoires et les biberons. Le recours à l'animal est indispensable pour ce projet. En effet, nous ne pourrions nous rendre compte des éventuelles différences qu'en ayant recours à un organisme vivant dans sa totalité. Nous utiliserons 112 animaux répartis en 14 groupes :

56 mâles – 3 fournisseurs d'aliment – 2 catégories d'aliment (R03-utilisé pour les souriceaux et R04 utilisé couramment pour les adultes). 2 types d'aliments (origine végétale (nouvel aliment) et origine en partie animale (ancien aliment)).

56 femelles réparties de la même façon.

Le détail des aliments par fournisseur est le suivant :

Fournisseur 1 : protéines animales R03 et R04 (aliment utilisé couramment dans nos services) + protéines végétales R03 (R04 n'existant pas pour ce fournisseur).

Fournisseur 2 : protéines végétales R03 et R04.

Fournisseur 3 : protéines végétales R03 et R04.

Les régimes protéines animales ne sont pas commercialisés par deux des fournisseurs.

Le nombre de souris par groupe a été calculé à son minimum pour obtenir des valeurs statistiques exploitables. Toutes nos procédures, classées en niveau de douleur léger, sont effectuées par des techniciens formés et ayant l'habitude des gestes pratiqués. Le poids des souris est régulièrement surveillé. Si une perte de poids supérieur à 20 % du poids de la souris est constatée, un isolement sera tout d'abord pratiqué. Si le poids de la souris n'augmente pas, elle sera euthanasiée pour éviter toute souffrance. Les autres points limites décidés pour ce programme sont la prostration, l'absence de toilette et la déshydratation.

**8799** Le cancer du sein est la première cause de décès liés à une pathologie tumorale chez la femme. Les métastases, qui se situent majoritairement dans les os, les poumons et le foie, sont la cause majeure des décès. Les mécanismes de la progression tumorale et de la dissémination métastatique dans le cancer du sein sont encore mal connus. Ils nécessitent plus de recherches afin de mieux appréhender les possibilités de traitement des malades.

Les métastases proviennent de cellules de la tumeur primaire, disséminées soit par le sang soit par la lymphe. Cette dissémination nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et lymphatiques (lymphangiogenèse) à partir de vaisseaux existants. Il s'agit de deux processus primordiaux dans le développement physiologique normal, mais également dans des pathologies vasculaires ou au cours du développement tumoral et dans la dissémination des métastases.

Nous venons de mettre en évidence un rôle crucial de deux facteurs de croissance circulants, BMP9 et BMP10, dans la maturation du réseau vasculaire sanguin et lymphatique. Qu'en est-il de leur implication dans la progression tumorale ?

Notre étude vise à approfondir la compréhension du rôle de BMP9 et BMP10 dans la régulation de la croissance tumorale et la dissémination de métastases. Elle utilisera des modèles rongeurs de tumeur mammaire, soit normaux soit privés de BMP10, soit privés de BMP9 et BMP10. A l'aide de ce modèle, nous analyserons la croissance tumorale, la dissémination métastatique pulmonaire, le développement du réseau vasculaire sanguin et lymphatique de la tumeur et des ganglions lymphatiques « sentinelles » (les plus proches de la tumeur).

Aucun modèle cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Les modèles rongeurs de cette étude sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (169) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test de Mann Whitney) qui sera appliqué pour chaque expérience. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats. Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. Le suivi des tumeurs sera réalisé par mesure à l'aide d'un pied à coulisse. La charge tumorale ne devra pas excéder 5% du poids normal de l'animal soit 1g ou environ 1cm<sup>3</sup> pour une souris de 20g. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée (injection d'un antalgique ou euthanasie de l'animal si nécessaire) dès le moindre signe de souffrance.

**8800** La nicotine est la substance psychoactive majoritairement incriminée dans les propriétés addictives du tabac, responsable de plus de 5 millions de morts chaque année. L'addiction présente une dynamique complexe depuis l'initiation de la prise de drogue jusqu'au développement de la pathologie seulement chez certains individus. Plusieurs facteurs de risque sont susceptibles de contribuer à la prédisposition à l'addiction. Un nombre croissant d'études suggère qu'il existe une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le microbiote intestinal et que ce dernier exerce une influence importante sur un ensemble de fonctions impliquées au cours de troubles psychiatriques tels que la dépression, l'autisme, mais également l'addiction. Des altérations du microbiote intestinal et du fonctionnement de l'axe cerveau-intestin ont été observées au cours du sevrage tabagique. Certaines hormones gastriques sont impliquées dans les effets de différentes drogues dont la nicotine, et influencent l'activité du système de récompense. Cependant, le rôle du microbiote intestinal dans les différents processus d'addiction à la nicotine n'a jamais été étudié. Les objectifs du projet consisteront à déterminer le rôle du microbiote intestinal sur l'action primaire de la nicotine, notamment sur les processus de récompense, et, à plus long terme, sur les conséquences d'une exposition répétée à la nicotine qui entraîne un remodelage de l'activité de structures impliquées dans différents processus affectifs et cognitifs, ainsi que sur la sévérité du syndrome de sevrage, susceptibles de contribuer au développement de l'addiction et à la rechute. A l'inverse, les conséquences de la prise de nicotine sur la composition du microbiote, ainsi que sur la perméabilité des barrières gastro-intestinale et hémato-encéphalique seront évaluées. Si des phénotypes sont identifiés, nous chercherons à en identifier les mécanismes sous-jacents. Des informations émises par le microbiote intestinal peuvent influencer le cerveau selon plusieurs mécanismes, notamment l'activation directe du nerf vague par le système nerveux entérique ou la production de métabolites passant dans la circulation sanguine par la barrière intestinale. Ces différentes modalités seront testées dans les phénotypes observées par reproduction des expériences après vagotomie ou blocage pharmacologique des métabolites d'intérêt. Enfin, nous rechercherons le rôle potentiel de certains sous-types de récepteurs nicotiques dans ces effets chez des animaux transgéniques. Des données suggèrent en effet qu'ils seraient impliqués notamment dans la modulation de l'activité du nerf vague dont l'acétylcholine est le principal neurotransmetteur. Pour évaluer l'impact du microbiote intestinal sur les processus mis en jeu au cours de la dépendance à la nicotine, qui est une maladie psychiatrique, il est essentiel d'étudier les comportements et les états psychologiques impliqués et affectés au cours de cette pathologie, tels que la façon dont l'individu prend volontairement la drogue, la façon dont il ressent le syndrome de sevrage. Ceci ne peut, par essence, être réalisé autrement que sur des animaux vivants, ayant un degré de développement de leurs fonctions émotionnelles et cognitives suffisants pour en faire des modèles d'étude pertinents. Nous anticipons l'utilisation de n=624 souris et n=648 rats, mâles âgés de 8 semaines à 12 mois. 5 procédures expérimentales seront utilisées de classe modérée. En utilisant les outils statistiques appropriés, nous avons réduit au minimum possible le nombre d'animaux utilisés. Nous prendrons toutes précautions pour éviter une souffrance psychologique et physique par l'utilisation de conditions optimales, au niveau de l'hébergement, du suivi et des soins. En effet, pour les procédures nécessitant des opérations chirurgicales, des antidouleurs seront appliqués localement avant et à la fin des chirurgies et les animaux placés sur tables chauffantes sous surveillance jusqu'au réveil. Par la suite, la souffrance potentielle des animaux sera observée quotidiennement dans les jours suivant les opérations.

**8801** Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction humaine et animale se sont amplifiées. Un faisceau d'évidences plaide pour une origine fœtale de troubles de la reproduction observés à l'âge adulte. Ces désordres résulteraient d'une exposition pendant la vie fœtale à des substances chimiques, qu'elles soient d'origine environnementales ou iatrogènes (médicaments, comme par exemple le Distilbène®). Beaucoup de femmes rapportent à l'échelle mondiale la consommation d'antalgiques et surtout de paracétamol à différents stades de la grossesse. Or, c'est précisément pendant la vie fœtale que se constitue la réserve d'ovocytes (gamètes) disponible pour la vie reproductive de la femelle adulte. Afin de mieux comprendre la sensibilité ovarienne au paracétamol, notamment en termes de fenêtres de sensibilité, une étude in vivo à l'échelle de l'organisme entier est indispensable (Remplacement).

Le rat, dont la métabolisation du paracétamol est comparable à celle de l'Homme, est choisi comme modèle expérimental. Par ailleurs, les étapes de différenciation des cellules fœtales ovariennes chez le rat présentent l'avantage d'être individualisées dans le temps, permettant ainsi de déterminer précisément s'il existe des fenêtres de sensibilité au paracétamol.

Nous avons effectué une étude sur la souche Sprague-Dawley dont les effets du paracétamol sont très ténus, contrairement à 2 études publiées sur la souche de rat Wistar. Nous souhaitons comprendre les différences inter-souches en termes de sensibilité au paracétamol en utilisant une autre souche (rat Wistar) et déterminer les éventuelles fenêtres de sensibilité.

Trois procédures seront mises en place, les résultats de la première déterminant la poursuite vers les deux suivantes. Dans le cas où les résultats obtenus pour la première expérience étaient négatifs, les procédures 2 et 3 seraient annulées. La procédure 1 a pour objectif de déterminer l'existence d'un effet du paracétamol sur la différenciation ovarienne chez le rat Wistar. Pour cela, un groupe contrôle (sans paracétamol) sera comparé à un lot traité au paracétamol durant la différenciation des gonades. La procédure 2 a pour but de déterminer s'il existe des fenêtres de sensibilité. Pour cela, le groupe contrôle sans paracétamol sera comparé à un groupe traité au paracétamol durant la différenciation des gonades, mais aussi à deux groupes exposés sur deux périodes distinctes de cette différenciation. Les deux premiers groupes seront réduits afin de minimiser le nombre d'animaux requis (Réduction). La procédure 3 vise à évaluer l'effet immédiat du paracétamol sur les gonades fœtales après exposition pendant différentes périodes au cours de la différenciation fœtale. Un total de 748 animaux, incluant 68 rattes gestantes et un maximum de 680 fœtus ou nouveau-nés sera nécessaire à cette étude, afin de répondre aux critères statistiques d'analyse des données.

La dose de 300 mg/kg/j de paracétamol utilisée dans les trois procédures correspond à une dose non toxique mais qui présente des effets sur l'ovaire. Toutefois, si les animaux présentaient des signes de souffrance, les points limites seront appliqués. Par ailleurs, afin de ne pas stresser les femelles gestantes, le traitement sera administré par le biais d'un biscuit vanillé contenant le paracétamol ou son solvant (groupe contrôle) (Raffinement).

Pour l'ensemble de ces trois procédures, les effets seront évalués par l'analyse histologique des ovaires, ainsi que par des approches au niveau transcriptomique et cellulaire. Par soucis de valorisation optimale des animaux utilisés, les testicules des nouveau-nés males seront collectés au même titre que les ovaires, et le sang sera également prélevé sur l'ensemble des portées afin d'évaluer dans un second temps l'impact du paracétamol sur le développement testiculaire.

Nous souhaiterions i) reproduire les effets du paracétamol sur la souche Wistar, et pouvoir comparer avec les résultats négatifs générés au laboratoire sur la souche Sprague-Dawley pour savoir s'il existe bien une différence entre ces deux souches ; ii) évaluer les différences de sensibilité des ovaires des fœtus in utero en fonction de différentes fenêtres d'exposition au paracétamol.

**8802** Notre programme de recherche vise à étudier les mécanismes pathologiques et à développer des approches thérapeutiques pour des maladies neurodégénératives. En particulier, nous nous intéressons aux nombreuses maladies causées par une désorganisation du cytosquelette, qui est un constituant cellulaire essentiel pour assurer la fonctionnalité des neurones. Dans cette classe de maladies, nous avons ciblé deux pathologies pour leur atteinte généralisée du système nerveux et leur agrégation massive du cytosquelette neuronal. Ainsi, en étudiant un nombre restreint de pathologies, nous proposons une stratégie pour minimiser l'expérimentation animale et dégager des mécanismes de dégénérescence partagés par de nombreuses maladies neurodégénératives fréquentes (telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.) et de proposer, dans le long-terme des approches thérapeutiques pertinentes pour le plus grand nombre de patients.

Notre laboratoire et de nombreuses autres équipes ont déjà proposé des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, en générant des modèles cellulaires. Bien que ces derniers aient été essentiel pour vérifier l'importance des gènes mutés dans la déstabilisation du cytosquelette, ils n'ont pas permis de révéler les mécanismes d'action aboutissant à la dégénérescence cellulaire. Même les études réalisées sur des neurones dissociés en culture n'ont pas permis d'étudier la complexité des mécanismes neurodégénératifs dans un contexte physiologique complexe, comme c'est le cas chez l'homme. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire de générer des modèles in vivo, qui par

ailleurs constitueront des modèles précliniques indispensables pour valider nos stratégies thérapeutiques avant de passer chez l'homme.

Afin de réaliser notre projet, nous avons élaboré une stratégie scientifique pour à la fois minimiser l'utilisation des animaux en expérimentation et réduire l'impact expérimental sur ces derniers. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le poisson zèbre (zébrafish) qui contrairement au modèle souris : i) génère un nombre très important de descendants par accouplement; ii) a une fertilisation ex utero (ce qui évite l'euthanasie des génitrices) et iii) nous permet une étude à un stade de développement précoce (< 5 jours post-fertilisation, avant l'autonomie) qui ne génère à priori pas de souffrance selon la directive européenne 2010/63/EU. Par ailleurs, le modèle zébrafish est établi comme un modèle de choix pour le criblage pharmacologique, ce qui permettra, avec un nombre d'animaux très réduit d'identifier des médicaments candidats, qui pourront ensuite être testés sur des modèles plus proches de l'homme comme la souris.

Aussi, nous soumettons au comité d'éthique la création de 6 nouvelles lignées de poissons et le maintien des adultes géniteurs en aquarium, ce qui représente, sur une durée de 5 ans, un nombre maximal total de 1100 poissons. Une surveillance quotidienne et la définition de point limites ont été établies pour définir le seuil au-delà duquel les adultes pourraient éventuellement présenter des dommages.

**8803** L'ensemble du corps humain et plus particulièrement l'intestin hébergent une communauté bactérienne résidente (microbiote), abondante et complexe, qui assure des fonctions essentielles pour la bonne santé de l'hôte ou au contraire le développement de maladies métaboliques, cardiovasculaires ou oncologiques. Le projet de recherche concerne la mise en place de colonies de souris « humanisées » avec différents microbiotes issus de patients sains ou atteints de pathologies telles que le diabète, l'obésité ou encore l'insuffisance cardiaque. Ces colonies permettront une nouvelle approche dans l'étude de la compréhension de l'apparition de ces maladies et dans leurs traitements.

La stratégie consiste à utiliser des animaux dépourvus de tout microbiote, élevés dans des enceintes stériles ou isolateurs. L'élevage en isolateur permet d'obtenir des animaux dépourvus de microorganismes.

Nous allons implanter dans ces souris un microbiote contrôlé issus de 4 groupes de patients humains : sains, diabétiques de type II, obèses ou insuffisants cardiaques.

Des fèces issus de ces différents types de patients sont mis en suspension dans une solution saline anaérobie. Le surnageant obtenu est alors administré lors d'une unique administration orale aux souris mâles et femelles.

Ces souris « humanisées » seront ensuite utilisées pour générer un élevage dont les caractéristiques du microbiote implanté se retrouveront dans les futures générations et permettront l'étude des différentes pathologies.

Nous estimons que nous utiliserons 30 trios (un mâle et deux femelles) de deux lignées de souris axéniques différentes et pour chacun des quatre types de microbiote par an soit un total de 3600 animaux sur la durée du projet.

Dans le cadre de notre projet, nous effectuerons simplement des implantations de microbiotes définis, sans conséquences pathologiques à priori sur les animaux; l'implantation d'un microbiote donné n'entraînant pas l'apparition de la maladie. En effet, ce microbiote entraînera une susceptibilité accrue à l'apparition ou la sévérité des pathologies lors de mise sous régimes spécifiques ou de modèles chirurgicaux que nous décrivons dans un autre projet qui sera soumis au comité d'éthique ultérieurement.

Notre protocole expérimental respecte la règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement. Les mécanismes « d'humanisation » mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte que la culture de cellules en tapis ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié pour ce projet comprend actuellement l'utilisation de souris. Le nombre d'animaux utilisés est réduit pour atteindre une valeur minimale sans nuire à la qualité statistique des données. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (élevage en isolateur, litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulée,.) avec une surveillance quotidienne, week-end et jours

fériés inclus. Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu (type feuille de cellulose, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). Enfin, la souffrance éventuelle des animaux sera minimisée autant que possible et nous interviendrons immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Tout animal présentant un aspect inhabituel : prostration, pelage terne et hirsute, traces de blessures infligées par les autres animaux sera isolé. Il fera l'objet d'une attention accrue et bénéficiera de soins appropriés (désinfection des plaies ou accès facilité à la nourriture si nécessaire). Si aucune amélioration de son état n'est constaté, il sera euthanasié le plus rapidement possible pour éviter toute souffrance inutile.

**8804** L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait ainsi de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime (phénomène dit de « yo-yo »). Seule une intervention chirurgicale associant une réduction de la taille de l'estomac et une déviation de l'intestin est à ce jour efficace à long terme pour traiter l'obésité. Cependant, les risques et effets secondaires liés à cette chirurgie en font un choix de dernier recours réservé aux cas d'obésité les plus graves. Nous manquons ainsi d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires.

Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel. Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids. Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus.

Notre projet vise à étudier le rôle d'une population de neurones de l'hypothalamus exprimant la POMC (« pro-opiomélanocortine »). Ces neurones sont notamment responsables de la satiété. Ils communiquent avec d'autres neurones avec lesquels ils sont connectés en produisant différentes molécules, appelées « neurotransmetteurs ». Parmi ces molécules, le glutamate est particulièrement important car il provoque une excitation rapide des neurones qui le reçoivent. Nous savons qu'une sous-population de neurones à POMC utilise le glutamate comme moyen de communication, mais les conséquences fonctionnelles de cette communication sont encore inconnues. Notre but est donc de découvrir le rôle des neurones à POMC qui produisent le glutamate dans la régulation de la balance énergétique.

Pour ce faire, nous étudierons un modèle de souris génétiquement modifiées où une protéine peut être enlevée des neurones à POMC quand on le souhaite, rendant alors impossible la communication avec du glutamate. Ces souris seront comparées à d'autres souris de la même fratrie chez qui la protéine sera toujours présente et la communication inaltérée. Les conséquences de l'absence de cette protéine sur la régulation de la balance énergétique seront révélées au travers de diverses procédures expérimentales, allant de l'exposition à un régime riche en calories à l'injection de molécules qui influencent l'appétit. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation du poids corporel et seront cruciales pour déterminer si les neurones à POMC produisant le glutamate représentent une cible thérapeutique intéressante pour le développement d'un nouveau médicament.

Nous utiliserons au total un maximum de 432 souris adultes (âgées d'au moins 8 semaines) sur 5 ans. La souris représente un modèle de choix pour notre projet de par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux



de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. En respect du principe de 3Rs, nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre tient aussi compte du fait que les expériences seront réalisées deux fois de manière indépendante afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

**8805** L'environnement familial et socio-économique, la génétique et l'éducation sont des facteurs de risque déjà bien connus amenant à développer une obésité. Cependant, ce risque d'obésité pourrait également être transmissible directement de la mère à l'enfant puisque l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère avant la gestation, plus que celui du père, est le meilleur prédicteur du risque d'obésité de l'enfant à 8 ans. Parmi les voies de transmission possibles de la mère à l'enfant, un faisceau de constats scientifiques désigne les microbiotes maternels comme bons candidats. Premièrement, de nombreuses données font état de différences de composition des microbiotes (fécal ou associé au lait) entre mères obèses et mères normo pondérales. De plus, le microbiote intestinal de l'enfant est majoritairement déterminé par ceux de sa mère. Enfin, les bactéries intestinales apparaissent influencer le fonctionnement des zones cérébrales impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique d'une part, de l'appétit et de la satiété d'autre part.

L'hypothèse de ce projet est que le transfert de microbiotes spécifiques de mères sensibles ou résistantes à l'obésité vers leurs descendants serait responsable de modulations différentielles de la maturation des circuits neuronaux hypothalamiques et du tronc cérébral chez la descendance, et contribuerait de ce fait à différentes programmations de la régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique, ce qui prédisposerait ou non la descendance à l'obésité à l'âge adulte.

Ce projet nécessite la manipulation dirigée du microbiote intestinal des descendants. Pour des raisons d'éthique évidentes, un tel projet ne peut être réalisé chez l'Homme. En outre, l'expérimentation *in vitro* ne permettrait pas de conserver la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu dans l'axe intestin-cerveau, nécessaires dans cette étude. En conséquence, l'usage d'un modèle animal ne peut être remplacé.

Le projet proposé vise à la réalisation de 3 objectifs :

- Opérer, au cours du développement néonatal, le transfert de microbiotes issus du vagin, du lait et de fèces collectés au cours d'un précédent projet à partir de rates génétiquement prédisposées à l'obésité et de rates génétiquement résistantes à l'obésité, ou de souches bactériennes pures représentatives de ces microbiotes chez des rats nés de rates d'une 3<sup>e</sup> souche génétique
- Caractériser les impacts à la fois immédiats (avant le sevrage) et à moyen et long termes (jeune adulte, adulte) de ces transferts sur le microbiote intestinal, le statut métabolique, le comportement alimentaire ainsi que sur la structure des zones cérébrales cibles (hypothalamus et tronc cérébral) chez les descendants ;
- Evaluer la capacité de ces transferts de microbiotes à reproduire le phénotype des descendants des mères prédisposées à l'obésité ou celui des descendants de mères résistantes à l'obésité.

Pour ce faire, 3 types de rates seront utilisés : les lignées de rates non consanguines Sprague Dawley sélectionnées sur leur propension à développer ou non une obésité (rats OP et rats OR) seront utilisées pour produire les portées utilisées comme références alors que les portées soumises à transfert de microbiotes seront produites à partir de la lignée consanguine FISCHER F344.

Au total, 514 rats (10 mâles reproducteurs, 72 rates gestantes puis allaitantes et 432 de leurs descendants) seront utilisés pour ce projet. Ce nombre, bien qu'élevé, a été réduit au minimum et prend en compte :

i) les risques de non fécondation, particulièrement élevés pour certaines des lignées de rates utilisées dans ce projet (ie rates Sprague Dawley Obese Prone, cf Levin & Govek en 1998 Am J Physiol 275 : R1374) ;

ii) les risques de cannibalisme, et

iii) la fréquence d'obtention de portées de taille égale ou supérieure à 8 ratons,

Le tout en satisfaisant la nécessité d'obtenir un nombre suffisant de ratons dans chaque groupe expérimental, pour permettre une exploitation statistique fiable des données particulièrement sensibles à la variabilité interindividuelle telles que les indicateurs du comportement alimentaire.

Pour réduire le nombre d'animaux euthanasiés, certains des animaux (6 mâles reproducteurs, 8 rates OR, 12 rates OP et 14 rates FISCHER F344) nécessaires à la mise en œuvre de ce projet seront réutilisés à partir d'un projet précédent.

Pour optimiser au mieux l'utilisation d'animaux, les mères FISCHER gestantes surnuméraires (au maximum 10 selon le taux de succès des saillies et la taille de leurs portées) et leurs descendants excédentaires seront utilisés pour une étude ancillaire destinée à mettre en relation maturation néonatale de la muqueuse intestinale et diversification du microbiote : ces ratons seront alors utilisés pour la réalisation de prélèvements post-mortem de parois et de contenus intestinaux, aux 14e, 16e, 18e, 20e, 22e et 25e jours de vie ((1 à 2/portée à chaque âge).

L'ensemble des procédures prévues relève de la classe de sévérité « légère ». Les situations susceptibles d'engendrer un stress ou une douleur de courte durée chez les animaux seront, pour les ratons nouveau-nés, les administrations quotidiennes d'inoculas microbiens au cours des 15 premiers jours de vie et, pour les descendants conservés après sevrage : l'hébergement en cage individuelle des rats sur une longue période, (en présence systématique d'enrichissement), le placement en cage physiologique, la réalisation de prélèvements sanguins, d'injections intra-péritonéales nécessaires à la caractérisation du statut métabolique ou de la sensibilité à la leptine et celle de tests comportementaux.

Pour s'assurer au maximum du bien-être des animaux, les cages individuelles seront enrichies (feuille de cellulose ainsi qu'un tunnel en polycarbonate 150x80mm), les interventions seront réalisées par du personnel compétent et l'évaluation de la douleur se fera par une observation quotidienne des animaux basée sur de multiples critères comportementaux, physiologiques, et d'apparence. Ceci permettra d'établir un score pour chaque animal à partir duquel les éventuelles décisions d'administration d'analgésiques ou de mise à mort seront établies. Les prélèvements d'organes seront effectués après anesthésie profonde et analgésie ou après anesthésie profonde conduisant à l'euthanasie de l'animal.

**8806** L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait ainsi de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime (phénomène dit de « yo-yo »). Seule une intervention chirurgicale associant une réduction de la taille de l'estomac et une déviation de l'intestin est à ce jour efficace à long terme pour traiter l'obésité. Cependant, les risques et effets secondaires liés à cette chirurgie en font un choix de dernier recours réservé aux cas d'obésité les plus graves. Nous manquons ainsi d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires.

Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent le poids corporel. Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids.

Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus.

Le but de ce projet est de créer 2 nouvelles lignées de souris transgéniques pour lesquelles il sera possible d'enlever une protéine dans certaines populations de neurones de l'hypothalamus. Chaque création de lignée se fera par croisement de 2 autres lignées. C'est leur descendance qui sera observée dans ce projet.

La première lignée sera constituée de souris dont une protéine est absente des neurones exprimant le Sf1 (« steroidogenic factor 1 ») qui sont connus notamment pour leur rôle dans l'adaptation du corps à un régime hypercalorique. Cette protéine permet en temps normal de détecter les niveaux d'énergie et de nutriments au sein des neurones : elle est donc importante pour la régulation de la balance énergétique. La deuxième lignée sera constituée de souris pour lesquelles il sera possible d'enlever quand on le souhaite une autre protéine dans les neurones exprimant la POMC (« pro-opiomélanocortine »), qui sont ceux responsables de la satiété. La protéine pouvant être enlevée dans cette lignée participe à la capacité des neurones à communiquer entre eux. Dans ce projet, nous observerons le développement des premiers individus de chaque lignée, de la naissance à l'âge adulte, afin de vérifier que les modifications génétiques n'interfèrent pas avec le développement normal des animaux.

Les informations apportées par l'étude ultérieure de ces nouvelles lignées nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation du poids corporel et seront cruciales afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques pour le développement d'un médicament.

La règle des 3Rs sera respectée en ce qui concerne la « Réduction » en suivant les recommandations du réseau ROCAD pour l'évaluation des lignées de souris génétiquement modifiées et en effectuant une évaluation comportementale sur un échantillon représentatif de 14 souris par lignée. Au total, nous utiliserons donc 28 souris dans ce projet. Afin de « Raffiner » nos expériences, un soin particulier sera apporté à la qualité des conditions d'hébergement : les souris seront hébergées en cages collectives, avec un enrichissement à base de carrés de cotons. Le suivi du bien-être des animaux sera assuré quotidiennement. Enfin, aucun « Remplacement » ne pourra être envisagé puisque ce projet a pour objectif d'évaluer le développement des animaux générés.

**8807** La vaccination par la voie intranasale vise à protéger les animaux contre un pathogène qui pénètre dans l'organisme par cette voie. La vaccination à ADN est une des alternatives vaccinales. Dans ce cas, le vaccin est composé d'une molécule d'ADN. Si on administre ce type de vaccin tel quel par voie intranasale, il sera rapidement détruit par certains composants de la muqueuse. C'est pourquoi il doit être transporté par un vecteur qui le protégera de la dégradation et qui lui permettra en sus d'atteindre son lieu d'action.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné 4 vecteurs déjà utilisés dans le cadre de la vaccination à ADN par voie intranasale, mais pour d'autres espèces animales. Puis nous avons vérifié in vitro que ces vecteurs fixent bien l'ADN et qu'ils permettent l'entrée de l'ADN dans des cultures de cellules où il a été actif.

Puis, et c'est l'objet de ce projet, ces 4 vecteurs devront être évalués pour leurs capacités à permettre l'entrée de l'ADN dans les cellules de la muqueuse nasale porcine, c'est-à-dire le site dans lequel la réponse immunitaire sera initiée. Pour cela, un ADN plasmidique marqueur associé à chacun de ces 4 vecteurs sera administré à des porcs par voie intranasale à l'aide d'une seringue sans aiguille et l'intensité du marquage dû à l'ADN administré sera analysée dans les muqueuses 48 ou 72 heures plus tard. A la suite de ces investigations, un des vecteurs qui a permis un bon marquage des muqueuses nasales sera associé à un vaccin à ADN proprement dit, et le complexe vaccin ADN – vecteur sera alors évalué pour sa capacité à induire une protection vaccinale.

Les vecteurs seront évalués 2 par 2. Au total, deux procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R. Tout d'abord le nombre d'animaux sera réduit au seuil de la pertinence scientifique et statistique (8 animaux pour chaque procédure, au total N=16 animaux). Pour le raffinement, les conditions d'hébergement viseront à limiter l'angoisse potentielle des animaux (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés, etc.) et des mesures basées sur des atteintes de points limites (réactivités des animaux à des stimuli, hyper et hypothermies, pertes d'appétits et/ou pertes de poids sévères) ou l'apparition de douleurs ou de

blessures sont prévues pour limiter la souffrance des animaux, le cas échéant. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer la prise en charge par les muqueuses nasales porcines de l'ADN vaccinal. Il n'existe pas en effet de lignée cellulaire pouvant imiter la complexité des muqueuses.

**8808** Dans les pays développés, l'accident vasculaire cérébral (AVC) représente la première cause de handicap acquise de l'adulte. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe à l'heure actuelle qu'un seul médicament disponible pour les patients. Or celui-ci doit être administré rapidement après l'AVC, et à peine 5 % des patients peuvent en bénéficier. Dans cette optique, plusieurs molécules ont été développées et pré-sélectionnées suite à des tests sur des cellules en culture (in vitro). L'objectif de cette étude est double 1) déterminer la répartition de ces molécules dans les différents organes après injection intraveineuse (biodistribution), 2) évaluer leur toxicité.

Dans ce contexte, l'étude de la distribution des formulations dans les organes et leur impact en termes de toxicité ne peut être réalisée que sur un organisme vivant et la souris est le meilleur modèle animal permettant d'atteindre nos objectifs. Cette étude nécessitera 336 souris, nombre justifié par le nombre de molécules à tester. Les souris maintenues en contention recevront une injection unique des molécules à tester, par voie intraveineuse, après anesthésie locale. Les molécules d'intérêts étant marquées, elles sont détectables par imagerie de fluorescence. A des temps déterminés, les souris seront donc anesthésiées et placées dans le système d'imagerie pour une durée de 5 minutes au maximum pour localiser les molécules injectées. A 24h ou 1 mois après l'injection les souris seront anesthésiées et euthanasiées. Leur sang et leurs organes seront collectés pour évaluer la toxicité éventuelle des molécules.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3 R, nous utiliserons l'imagerie optique, non invasive et non traumatisante, pour évaluer le profil de distribution en fonction du temps réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés au minimum. En effet, il ne sera plus nécessaire d'euthanasier l'animal pour localiser les molécules fluorescentes puisque celle-ci peut être évaluée en fonction du temps, grâce à l'utilisation de l'imagerie.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes. Des études préalables ont permis de sélectionner les molécules les plus efficaces, ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés.

La souffrance des souris sera réduite au maximum. Les procédures invasives ou d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale ou locale. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence, son comportement, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études, nous pourrions identifier de nouvelles molécules actives dans le traitement des AVC.

**8809** Les cancers du sein représentent la deuxième cause des décès par cancer chez la femme, principalement en raison des métastases qu'ils induisent, notamment au niveau des os. Ces cancers constituent un ensemble hétérogène dont ceux dits « triple négatif », sont les plus agressifs. Les cancers du sein triple-négatif (CSTNs) représentent 20% des cancers du sein, et les patientes atteintes de CSTN ont un taux de récurrence à distance (métastases) plus élevé et un pronostic plus faible que les patientes atteintes d'autres types de cancers du sein. Clairement, il est essentiel de mieux comprendre les bases moléculaires des CSTNs et développer des traitements efficaces pour ce type de cancer très agressif, d'autant plus qu'il affecte en majorité des patientes jeunes (moins de 50 ans).

L'immunothérapie des cancers a longtemps représenté une option thérapeutique marginale en dépit de forts arguments démontrant le rôle du système immunitaire dans le contrôle de la progression des cancers. Les mécanismes immunitaires impliqués sont multiples et certains sont notamment liés à des altérations du réseau des chimiokines. Situé dans le contexte des métastases osseuses de CSTN, notre projet vise à étudier les effets de traitements associant deux stratégies complémentaires d'immunothérapie, l'une visant à déjouer les effets délétères de la chimiokine CCL5, l'autre visant à

bloquer des checkpoints immunitaires. Le but ultime de notre projet est de proposer le plus rapidement possible en clinique, un traitement le plus efficace possible.

La chimiokine CCL5 qui est sécrétée par les cellules épithéliales mammaires saines uniquement dans des conditions inflammatoires, est, en revanche, produite en continu par les cellules mammaires malignes. Son expression particulièrement élevée dans les CSTNs, est positivement corrélée à la progression de la maladie. Plusieurs études pré-cliniques visant à neutraliser CCL5 ont mis clairement en évidence que cette chimiokine contribue à la paralysie du système immunitaire face aux cellules cancéreuses et facilite la croissance des tumeurs. Par ailleurs, l'activation des T au cours de la réponse immunitaire, notamment anti-tumorale, est régulée par un ensemble de signaux co-activateurs et de signaux co-inhibiteurs appelés checkpoints immunologiques. De nouveaux traitements anticancéreux ont été développés pour bloquer ces checkpoints et ont donné des résultats spectaculaires en termes de régression des tumeurs notamment dans le mélanome métastatique.

A l'aide de 2 modèles précliniques murins de métastases osseuses de CSTN, notre projet qui nécessitera 624 souris a pour objectif d'évaluer dans quelle mesure la stratégie de 'blocage' de CCL5 (à l'aide de Maraviroc, un inhibiteur synthétique spécifique) en combinaison avec des traitements anti-checkpoints (à l'aide d'anticorps spécifiques), représente une approche efficace pour contrer le développement des métastases osseuses de CSTN.

D'un point de vue expérimental, nous proposons d'utiliser les lignées cancéreuses murines 4T1 (CSTN issu d'une souris Balb/c) et EO771 (CSTN issu d'une souris C57/Black6) qui injectées dans le fémur des souris reproduisent le contexte de métastases osseuses de cancer du sein.

En terme de remplacement, Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives in vitro permettant de reproduire l'environnement immunitaire d'une tumeur.

En terme de réduction, le nombre de souris a été calculé pour limiter l'utilisation des animaux tout en assurant des résultats statistiquement fiables.

En terme de raffinement, tous les animaux utilisés seront manipulés le plus paisiblement possible et hébergés par 4 dans des cages enrichies avec un igloo et des tiges/carrés de coton afin de limiter au maximum leur stress. Les animaux recevront un traitement anti-douleur pendant toute la durée de l'expérimentation. Les animaux seront visités régulièrement afin de 1- détecter tous signes de souffrance/inconfort et 2- mettre en place des traitements/solutions adaptés aux problèmes identifiés.

**8810** La palpation réalisée lors d'un examen médical permet au praticien d'évaluer manuellement si les propriétés mécaniques des tissus sont altérées par une pathologie, comme le cancer ou la cirrhose. Hors, cette palpation directe est limitée aux organes accessibles à travers la peau, et ne fournit pas de données quantitatives. Ainsi, des méthodes non-invasives dites de « palpation virtuelle », utilisant l'imagerie médicale, ont été développées afin de permettre de quantifier des modifications locales des propriétés mécaniques, liées à une pathologie. Par ailleurs, les Gestes Médicaux et Chirurgicaux assistés par Ordinateur (GMCAO) font appel à des modèles numériques qui ne peuvent être réalistes qu'avec une connaissance exacte des propriétés mécaniques des tissus. Les données biomécaniques actuellement utilisées ont été principalement mesurées ex vivo, c'est-à-dire dans des conditions non physiologiques, et « standardisées » qui ne permettent pas de créer un modèle spécifique à chaque patient.

Ce projet vise à valider des méthodes de mesure in vivo des propriétés mécaniques des tissus, à obtenir des bases de données de ces propriétés mécaniques, ainsi qu'à étudier leur lien avec d'autres paramètres tels que la température, la pression artérielle, la pression portale ou la structure du tissu. Il est commun à deux projets de recherche, concernant la mesure des propriétés mécaniques in vivo. Le premier projet propose une méthode de mesure des propriétés mécaniques non-linéaires en grandes déformations, à l'aide des ultrasons. Le second projet consiste au développement de techniques d'Elastographie par Résonance Magnétique (ERM) afin de mesurer les propriétés mécaniques linéaires des tissus.

Les méthodes de mesure utilisées sont non invasives. Elles utilisent les modalités d'imagerie radiologiques, comme l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou les ultrasons. Dans les images obtenues, la propagation d'une onde mécanique, ou l'effet d'une contrainte mécanique, dans le tissu,

est visualisée. L'analyse des images acquises permet d'extraire les propriétés mécaniques de ces tissus, in vivo en conditions physiologiques (perfusion, conditions aux limites...).

Les organes abdominaux (foie, pancréas, rein...) ou les muscles seront étudiés. Par ailleurs, les muscles des membres représentent un excellent modèle de validation car ils demeurent statiques malgré les mouvements physiologiques (pas de stratégie de synchronisation à mettre en œuvre). Ces mêmes tissus seront visés dans le cadre de l'obtention de bases de données des propriétés mécaniques.

Afin de modifier localement les propriétés mécaniques des tissus, des méthodes d'hyperthermie percutanées (laser, radio-fréquences, ultrasons...) seront utilisées. Ceci vise à créer des modifications locales des propriétés mécaniques, afin de valider l'étendue de mesure des méthodes testées, car les propriétés mécaniques varient d'un sujet à un autre, mais aussi en fonction de l'état de santé. Par exemple un tissu hépatique cirrhotique est jusqu'à 50 fois plus dur que le foie sain. Si les modifications locales des propriétés mécaniques sont ici l'objectif principal, l'évolution temporelle des propriétés mécaniques des tissus lors de la création de ces modèles est également d'intérêt.

Ce projet respecte le principe des 3R :

**Remplacement :** Il n'y a pas de méthodes de remplacement. Les méthodes développées sont tout d'abord testées et validées sur des fantômes (objets tests conçus à partir de gels, tissus ex vivo...). Cependant, les conditions in vivo (conditions aux limites, propriétés des tissus perfusés, en mouvement, etc...) ne peuvent être reproduites. Le recours à l'animal est nécessaire. Le modèle porcin est un modèle de choix, car son anatomie abdominale et sa taille sont similaires à celles de l'Homme.

**Réduction :** Les expériences sont mutualisées entre deux projets afin de réduire le nombre total de sujets. Poursuivant le même objectif, plusieurs organes seront considérés chez chacun des sujets. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori, les variabilités biomécaniques attendues étant inconnues. L'utilisation de 50 animaux (10/an) doit être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants. Le rythme d'un sujet par mois environ est prévu afin d'analyser l'expérience précédente avant d'initier la suivante, afin d'éviter tout double emploi injustifié.

**Raffinement :** Il n'y aura pas de survie du sujet expérimental. Chaque sujet sera euthanasié selon notre protocole sans réveil (injection létale sous anesthésie). Néanmoins, l'angoisse liée au déplacement de la cage à la plateforme d'imagerie sera contrôlée par une injection intramusculaire de kétamine (20mg/kg) ou Zolétil (10mg/kg) + azaperone (2mg/kg) 10 minutes avant la procédure. Ensuite l'induction sera pratiquée avec injection intraveineuse de Propofol (3mg/kg) + rocuronium (0.8mg/kg). L'anesthésie sera maintenue avec de l'isoflurane 2% dans l'oxygène.

L'étude inclue principalement des périodes d'imagerie (IRM, ultrason) sous anesthésie générale sans aucun geste invasif associé, c'est-à-dire sans douleur. Ponctuellement, des procédures percutanées (« à travers la peau », typiquement via une aiguille) seront réalisées (chacune durant entre 1 et 10 minutes).

**8811** L'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un produit (médicament, agent de contraste...) nécessite au préalable de caractériser notamment sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamique. La pharmacocinétique consiste à évaluer l'absorption, la diffusion, la métabolisation et l'excrétion du produit par l'organisme. Elle permet notamment d'améliorer les dosages et la posologie du produit par l'étude de sa concentration sanguine au cours du temps. Elle permet également de déterminer les voies d'administrations optimales selon la métabolisation du produit dans l'organisme. La pharmacodynamique consiste quant à elle à évaluer les effets du produit sur l'organisme.

Ce projet a pour objectif de caractériser la pharmacocinétique et la pharmacodynamique après administration de produits chez le lapin, le rat et la souris.

Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'évolution et les effets d'un produit dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Le recours à l'imagerie médicale (imagerie à rayons X ou imagerie optique) dans ce projet permet de suivre au cours du temps la distribution de produits radio-opaques ou rendus fluorescents de manière quantitative et spatiale. Cette méthode d'analyse présente l'avantage d'être non invasive, nécessitant seulement une anesthésie générale. Elle permet également de suivre un même animal au cours du

temps et donc de diminuer l'impact de la variabilité individuelle sur les résultats et de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

En fonction des espèces, un nombre différent d'animaux par groupe et par étude sera prévu :

- Lapin : 300 lapins au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 30 lapins par étude soit à 3 groupes de 10 lapins et 10 études au cours des 5 années.

- Rat : 500 rats au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 50 rats par étude soit à 5 groupes de 10 rats et 10 études au cours des 5 années.

- Souris : 2000 souris au total sont prévues dans ce projet, ce qui correspond à 100 souris par étude soit à 5 groupes de 20 souris et 20 études au cours des 5 années.

Les groupes, le nombre d'animaux et d'études pourront varier pour chaque espèce, mais le nombre total d'animaux prévus dans ce projet ne pourra pas être supérieur à la prévision annoncée.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en cages ou en enclos pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social.

Des points limites ont été définis afin de préserver le bien-être des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et des soins seront apportés aux animaux lorsque nécessaire (désinfections des plaies, réchauffement, réhydratation, etc).

**8812** Les stimulateurs cardiaques (SC) et les défibrillateurs automatiques implantables (DAI) ont révolutionné le traitement des patients atteints d'arythmie cardiaque. Depuis l'implantation du premier SC en 1958, cette thérapie a connu une importante expansion. Au cours des dernières décennies les générations successives de SC, DAI et des sondes cardiaques associées, qui permettent d'écouter et de modifier l'activité électrique du cœur, ont connu d'énormes développements et les activités de recherche et de développement visant à améliorer ces dispositifs se poursuit activement.

En raison de l'importance textuellement vitale de ces dispositifs pour les patients et de leur durée d'implantation longue, la validation de chaque évolution des dispositifs utilisés en rythmologie et de leurs accessoires doit être pratiquée sur des animaux avant tout essai clinique. Ces phases de validation préclinique permettent également de vérifier l'ergonomie de l'implantation pour les chirurgiens et de l'utilisation pour les cardiologues.

Nous envisageons de réaliser des essais d'implantations aiguës et chroniques chez des animaux dont les caractéristiques anatomiques et physiologiques sont proches de celles de l'Homme, à savoir le mouton, le porc et le chien dont les cœurs ont des dimensions comparables à celui de l'Homme dont les caractéristiques électrocardiographiques sont proches de celles de l'Homme. Le nombre total d'animaux envisagé est de 109 répartis en 51 chiens, 21 porcs, 37 ovin.

La taille de groupes d'animaux a été réduite à 9 individus au total pour les essais liés à la mise au point technique des instruments puis à 6 individus pour les essais aigus et à 8 pour les effets chroniques, ces effectifs sont les minimaux envisageables pour détecter des anomalies ou des événements indésirables majeurs avant une demande d'approbation d'un essai d'implantation chez l'Homme. Les animaux bénéficieront d'une analgésie post-opératoire complète et, bien que l'inconfort décrit par les porteurs de SC et de DAI soit mineur, les animaux seront surveillés quotidiennement et ils pourront être tranquilisés si les manipulations liées à la communication entre le dispositif et son ordinateur de programmation s'avéraient stressantes.

**8813** La fibrose, cicatrice anormale après agression des tissus, est une affection irréversible qui s'aggrave au cours du temps. Ce phénomène peut affecter la plupart des organes dont les poumons, les reins, le foie, les yeux, le cœur ou la peau et représente un problème majeur de santé publique. La fibrose est en effet responsable de 45 % des décès dans les pays industrialisés. Les mécanismes à l'origine de ce processus restent actuellement largement méconnus. Un des enjeux majeurs de ces dernières années consiste à mieux appréhender les causes et les mécanismes de cette maladie afin de développer de nouveaux marqueurs diagnostiques, pronostiques et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, ce projet consiste à tester chez la souris de type C56BL6 le potentiel anti-fibrotique de 10 molécules précédemment identifiées par notre laboratoire sur des modèles cellulaires in vitro. En

particulier, nous utiliserons différents modèles murins couramment utilisés dans la littérature scientifique : fibroses hépatique, rénale et pulmonaire.

De plus, la fréquence de la plupart des pathologies fibrotiques étant fortement augmentée après 50 ans, nous incluons également dans notre étude des souris âgées (18 mois) pour être plus représentatif de la pathologie humaine.

Nous avons développé ce projet dans un souci de respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le processus de fibrose étant un processus dynamique mettant en jeu de nombreux types cellulaires, son étude ne peut se concevoir que sur organisme entier et de ce fait nécessite de recourir à l'expérimentation animale.

Réduire : Les modèles utilisés dans ce projet sont complémentaires et utilisent des procédures déjà mises au point et couramment décrites. Les différentes procédures mises en œuvre pour ce projet ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

Raffiner : Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques en expérimentation animale. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec des cotons de nidification. Une surveillance régulière des animaux sera effectuée afin de déterminer toute douleur ou souffrance éventuelle qui sera prise en charge le cas échéant, et des points limites pertinents seront déterminés.

Pour la mise en œuvre de ce projet qui durera 5 ans, le nombre total d'animaux estimé est de 2190 souris.

**8814** La Vulvovaginite à Candida (VVC) est un problème de santé majeur pour les femmes en âge de procréer, 75% d'entre elles connaissant au moins un épisode de VVC au cours de leur vie. L'étude des mécanismes d'action de cette vaginose fongique et l'établissement de traitements adaptés nécessitent notamment l'utilisation de modèles animaux.

En effet, l'infection à *C. albicans* passe à la fois par des mécanismes de virulence complexes, par des interactions avec le microbiote commensal et par les réponses immunitaires de l'hôte.

L'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* ne permettant pas de mimer la complexité de ces interactions, le recours à des modèles animaux s'avère nécessaire pour évaluer les effets de l'administration des traitements.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'effet de traitements probiotiques sur un modèle de vaginose à *Candida albicans* chez la souris.

Ce pathogène ne colonisant pas naturellement la muqueuse murine, un traitement préalable des souris par une injection sous cutanée d'oestrogènes est nécessaire. L'infection fongique est ensuite induite par administration d'un inoculum de *Candida albicans* dans la lumière vaginale. Trois souches de *Candida albicans* de virulences différentes seront utilisées lors de ces infections.

Les traitements probiotiques seront administrés par voie vaginale ou par voie orale. Les effets du traitement seront évalués à différents dosages du probiotique et à différents temps après implantation du pathogène fongique. En cas d'intolérance au produit (aggravation de l'inflammation provoquée par la candidose vaginale), les traitements des autres animaux ne seront pas réalisés.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire douze animaux par groupe. Quatre groupes seront constitués pour chaque condition de traitement étudiée, soit 48 animaux par condition. (e.g. 1) souris non infectées, non traitées 2) souris non infectées, traitées ; 3) souris infectées, non traitées ; 4) souris infectées et traitées). Ces quatre groupes sont nécessaires à chaque expérience pour avoir les groupes contrôle nécessaires lors de l'analyse des prélèvements.

Au maximum, 9216 animaux seront utilisés pour la durée maximale du projet. Ce nombre se décompose de la manière suivante : 4 groupes x 12 animaux x 3 souches de *C. albicans* x 2 formes galéniques du probiotique x 4 dosages du probiotique x 4 cinétiques de traitement x 2 voies d'administration du probiotique (orale ou vaginale)

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté, un suivi quotidien de leur bien-être et l'application de points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.



Durant la procédure, les infections comme les administrations de traitement se font sous anesthésie afin de réduire l'inconfort et le stress des animaux.

Le temps d'anesthésie est également réduit grâce à l'administration d'un antidote permettant d'annuler les effets de l'anesthésiant et ainsi de faciliter le réveil de l'animal

**8815** Le glaucome est la cause principale de cécité dans le monde. Une pression intraoculaire trop élevée étant le facteur essentiel de cette pathologie, le but des traitements est de contrôler cette pression intraoculaire (PIO) en réduisant la production d'humeur aqueuse ou augmentant l'évacuation de l'humeur aqueuse, dans le but de préserver la fonction du nerf optique.

Parmi les traitements du glaucome, le cycloaffaiblissement au laser diode, comme son nom le laisse supposer consiste à appliquer le laser diode au niveau du corps ciliaire par l'intermédiaire de la sclère en regard ou par voie endoculaire. Le corps ciliaire produisant l'humeur aqueuse, sa destruction partielle permettra de diminuer la production d'humeur aqueuse et par là même occasion une diminution de la pression intra-oculaire.

Mais en raison des effets secondaires graves de cette méthode (hypotonie, phthisis bulbi, baisse de l'acuité visuelle), cette technique est proposée aux glaucomes réfractaires qui résistent aux autres types de traitement. Le but de cette étude est de déterminer les modifications histologique et l'importance des lésions produites par le traitement laser diode au niveau du corps ciliaire.

Ce type de traitement peut avoir des effets secondaires définitifs, ce qui limite ses indications. Il est proposé aux glaucomes réfractaires qui résistent aux autres types de traitement. Le but de cette étude est de déterminer les modifications histologique et l'importance des lésions produites par le traitement laser diode au niveau du corps ciliaire.

En raison de la complexité des mécanismes à l'œuvre notamment au cours de la phase de cicatrisation, il n'est pas envisageable de réaliser ce genre d'étude sur des modèles inertes ou ex-vivo. Le lapin est le mammifère de taille la plus réduite sur lequel les essais de matériel destiné à un usage chez l'homme peuvent être utilisés.

Cette étude portera sur 24 yeux, soit 24 lapins, répartis en trois groupes, pour ne traiter que l'un des yeux des animaux.

3 lapins seront traités d'abord et une analyse histologique est faite pour évaluer l'importance des lésions et ajuster les paramètres du laser.

Puis les 3 groupes d'animaux seront traités. Le nombre de 7 animaux par groupe nous semble un minimum pour observer des différences sur des grandeurs non paramétriques telles que fournies par l'analyse des coupes histologiques prévues dans ce projet.

Le laser diode sera appliqué par voie transsclérale sur 24 yeux de 24 lapins (de manière à ne traiter qu'un des yeux pour des raisons de confort de l'animal) sous anesthésie générale de courte durée. Pendant la phase post-opératoire les animaux recevront un traitement analgésique à base de morphiniques. Les animaux sont répartis en trois groupe pour tester trois types de traitements.

Les lapins seront euthanasiés 20 jours après le traitement puis les yeux seront prélevés pour une étude histologique.

**8816** Les modèles murins génétiquement modifiés sont indispensables pour l'étude de

- la régulation et fonction de gènes,

- rôle d'un gène dans la formation de tumeur

- l'obtention de modèles pouvant être utilisés pour des tests thérapeutiques

Après une première étape d'analyse in vitro, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre les mécanismes sous-jacents au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à développer de nouvelles lignées murines pour permettre aux chercheurs d'avoir les outils les plus adaptés à leurs études. Bien évidemment, les lignées ne sont créées que si elles présentent un intérêt biologique potentiel et si elles n'existent pas par ailleurs dans d'autres établissements de recherche. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux nécessaires. Les nouveaux outils utilisant les nucléases ont un rendement supérieur à la transgénèse classique et permettent de diminuer le nombre d'embryons à injecter pour obtenir une lignée transgénique et donc moins de femelles donneuses d'embryons et de femelles réimplantées.

Nous prévoyons pour l'année à venir d'utiliser 1240 souris.

Dans un souci de raffinement, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux. Ainsi, les gestes techniques sont assurés par du personnel qualifié. Les procédures nécessitant des actes chirurgicaux sont réalisées sous anesthésie générale avec utilisation d'analgésiques adaptés (per-opératoires et post-opératoires). Le réveil se fait sur un tapis chauffant, dans un nuage de papier cellulosique pour recouvrir de l'anesthésie et de l'opération chirurgicale. La cicatrisation sur le flanc est contrôlée pour le bien être de l'animal. Dans tous les cas, une grille de suivi des signes cliniques sera appliquée à l'ensemble des animaux utilisés dans les procédures.

## **8817 I-CONTEXTE SCIENTIFIQUE**

Le neuroblastome de haut risque (NB-HR) est une maladie pédiatrique à pronostic très sombre. La présence d'une hétérogénéité clonale dans cette maladie a été suggérée depuis longtemps et les nouvelles techniques de séquençage ont permis de confirmer la présence de différents clones cellulaires caractérisés par des altérations génétiques différentes, qui auraient déterminé leur transformation maligne, avec l'émergence progressive de sous-clones qui coopèreraient dans la maintenance et la progression tumorale.

L'étude de l'évolution clonale est basée dans l'analyse séquentielle d'échantillons tumoraux, mais dans la majorité des tumeurs solides, comme le NB-HR, les biopsies multiples ne sont pas possibles. Des études récentes ont démontré l'utilité de l'étude du ctDNA (« Circulating Tumor DNA ») pour l'analyse de l'évolution clonale dans le NB-HR par l'analyse des anomalies génétiques spécifiques des cellules tumorales basée sur des prélèvements sanguins séquentiels.

L'étude de l'évolution clonale du NB-HR sous traitement ciblé s'impose dans le contexte actuel de développement de nouvelles molécules et représentera un outil pour mettre en évidence les mécanismes récurrents, pour ultérieurement prédire la réponse aux traitements ciblés. Nous souhaitons donc connaître l'évolution clonale du NB-HR sous thérapies ciblées pour comprendre quels sont les mécanismes de résistance et d'échappement thérapeutique survenant sous traitement.

### **II-OBJECTIFS DU PROJET**

Nous souhaitons confirmer l'hypothèse que la description d'événements déterministes dans le processus d'évolution clonale du NB-HR pourrait nous aider à comprendre l'évolution tumorale sous traitement et pendant le suivi par détection précoce des sous-clones d'intérêt.

L'objectif primaire de ce projet est l'étude des mécanismes de progression tumorale, résistance et échappement thérapeutiques du NB-HR, basé sur l'analyse de l'évolution clonale. Cette analyse sera faite par le profilage moléculaire de différents modèles de PDX (greffe de tumeurs de patients chez la souris) sous traitement ciblé, seul ou en combinaison avec de la chimiothérapie classique, et basé sur l'analyse séquentielle du ctDNA pendant le traitement. Cela sera réalisé en appliquant des techniques de biologie moléculaire sur le ctDNA de façon séquentielle à différents points du traitement des souris PDX de NB-HR.

Le but ultime de ce travail est de définir les meilleurs traitements combinés dans un contexte génétique donné et de réfléchir à comment les intégrer dans les futurs protocoles de prise en charge en 1ère ligne du neuroblastome de haut risque.

### **III-NOMBRE ET TYPE D'ANIMAUX**

Nous voulons donc développer plusieurs modèles de souris PDX de NB-HR, qui reproduisent plus fidèlement ce cancer que la xéno greffe dérivée de lignée cellulaire, afin de tester en préclinique des traitements ciblés en fonction de leur anomalies génétiques, seuls ou en combinaison avec d'autres médicaments, dont la chimiothérapie. Dans notre cas, le modèle de souris est incontournable avant une application clinique et ne peut être remplacé par des expérimentations in vitro.

Pour ce projet, le nombre de souris nécessaires, en tenant compte du principe de réduction, est de 148 souris. Les modèles de PDX utilisés seront déterminés après test in vitro des différentes combinaisons de drogues en fonction de l'anomalie génétique portée par chaque modèle et de la synergie montrée par les combinaisons testées in vitro.

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec utilisation de plaque chauffante pour éviter l'hypothermie des animaux. En cas de douleurs post-opératoires, des analgésiques seront

administrés. En accord avec les recommandations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal présentant une tumeur.

**8818** Le glioblastome est une tumeur primaire du système nerveux central, avec une faible médiane de survie (<15 mois), malgré l'arsenal thérapeutique déployé.

La recherche de nouvelles drogues ainsi que la compréhension de l'évolution de la tumeur dans son environnement tumoral est essentiel. A ce jour, il n'existe pas d'alternative pour caractériser notre lignée, créer un nouveau modèle de xénogreffe orthotopique de lignées GBM humaines chez la souris immunodéficiente et tester cette nouvelle molécule.

Notre projet se déploie donc en deux axes. Le premier concerne la caractérisation d'une nouvelle lignée cellulaire de glioblastome, sur son aspect tumorigénique et le second concerne l'évaluation d'une nouvelle molécule chimiothérapeutique contre les glioblastomes.

Dans les deux axes, les souris seront acclimatées dans leur nouveau lieu d'hébergement pendant 7 jours avant la chirurgie d'implantation des cellules dans le cerveau et avant le traitement avec la molécule thérapeutique à évaluer. Les souris seront réparties à 4 souris/cage afin de favoriser les échanges entre elles.

Les souris seront observées et pesées tous les jours, puis leur comportement sera soigneusement relevé. Après la chirurgie et avant le réveil, si le score de 2 (modéré) est atteint selon la grille d'évaluation, la souffrance sera prise en charge par administration d'un antalgique (buprénorphine, 0.1mg/kg) par injection sous-cutanée. Les points limites sont fixés et définis de telle façon que les souris soient euthanasiées si la souffrance atteint un grade sévère (changement de poids, prostration, condition physique dégradée). Les points limites sont détaillés dans la demande d'autorisation de projet.

Le nombre d'animaux est calculé en fonction des deux axes à développer : dans le premier axe, 40 souris seront nécessaires (8 souris réparties dans 5 groupes expérimentaux) et dans le second 60 souris sont utiles (12 souris réparties dans 5 groupes expérimentaux). Le nombre de souris est calculé sur les bases des rapports de la communauté scientifique en relation avec les objectifs expérimentaux. Cela explique pourquoi moins de souris sont nécessaires dans l'axe 1 que dans l'axe 2, dans lequel une nouvelle molécule chimiothérapeutique doit être évaluée.

Des tests statistiques seront utilisés dans les 2 axes afin de comparer : Axe1/la formation tumorale de la nouvelle lignée avec une lignée cellulaire connue, Axe 2/la survie globale et le progression tumorale entre les souris traitées avec le nouveau médicament versus celles traitées avec le médicament de référence versus celles non traitées.

Ces deux axes de recherche sont innovants et généreront des données scientifiques originales. Ils doivent être portés par une étude animale, a fortiori l'évaluation de la nouvelle molécule (axe2) avant d'être envisagée chez l'homme.

Ce projet entre dans la continuité d'un projet de recherche en cours depuis quelques années au laboratoire et est financé.

**8819** Les cancers de type mélanome uvéal sont des cancers de l'œil très agressifs. Bien que rares, ce sont les cancers les plus prépondérants dans cet organe. 50% des patients développent des métastases et il n'existe pas de thérapie efficace dans ces cas.

Nous étudions un gène dont l'inactivation dans ces tumeurs est un mauvais pronostic pour le patient. Le but de ce projet est de comprendre si l'inactivation de ce gène modifie la capacité migratoire des cellules tumorales et donc leur capacité métastatique. Nous avons analysé des cellules tumorales humaines inactivées ou non pour ce gène et analysons leur capacité de migration in vitro. Ce système est artificiel et ne permet pas de récapituler la complexité physiologique d'un organisme vivant. Pour cette raison, après avoir sélectionné les lignées cellulaires les plus agressives in vitro, nous devons vérifier leur capacité migratoire in vivo. Pour cela, nous prévoyons d'utiliser le poisson zèbre comme modèle animal. Ce petit poisson permet d'observer la migration des cellules tumorales au cours des stades embryonnaires et larvaires. Il nous permettra également d'analyser la croissance tumorale et la formation de métastases chez l'adulte en fonction des caractéristiques de la lignée cellulaire injectée.

L'étude préalable in vitro des lignées cellulaires tumorales nous permettra de remplacer au maximum l'utilisation d'un modèle animal et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour la visualisation en microscopie de la migration cellulaire au cours des stades précoces, nous analyserons 100 larves injectées, ce qui correspond à l'injection de 5 lignées cellulaires (20 larves par lignée). Nous prévoyons d'utiliser également 110 animaux pour le suivi de la croissance tumorale chez l'adulte (22 animaux par lignée), soit 210 au total. Les procédures pouvant générer une souffrance sont systématiquement conduites sous anesthésie. Les poissons injectés seront observés deux fois par semaine afin de s'assurer de leur bien-être et de détecter l'apparition potentielle de tumeurs. L'expérimentation sera arrêtée dès l'apparition de premiers signes de souffrance des animaux.

**8820** La dépression est un problème de santé publique majeur. Elle est l'origine de la majorité des cas de suicide. Si les antidépresseurs actuels sont efficaces, ils demeurent encore imparfaits. Notamment, un délai d'action de plusieurs semaines est nécessaire pour obtenir un effet de ces traitements. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc une priorité.

Récemment, il a été suggéré que le délai d'action des antidépresseurs pouvait être lié à un phénomène physiologique particulier : la neurogenèse hippocampique chez l'adulte. Ce projet vise donc à comprendre en détail le rôle fonctionnel de la neurogenèse adulte.

Dans l'hippocampe, des travaux notamment menés au laboratoire ont montré que la neurogenèse était stimulée par un traitement chronique aux antidépresseurs. Chez le rongeur, l'augmentation de la neurogenèse adulte hippocampique constitue un élément de la réponse aux traitements aux antidépresseurs et certains tests comportementaux dédiés à caractériser l'état émotionnel des animaux sont sensibles à la neurogenèse. Pour affecter ce comportement, nous supposons que les neurones nés à l'âge adulte sont impliqués dans des changements de neurotransmissions. Jusqu'à présent, ces changements de neurotransmissions dépendants de la neurogenèse demeurent peu étudiés, en particulier in vivo.

Pour évaluer de tels changements deux techniques seront combinées : l'optogénétique et la microdialyse intracérébrale. L'optogénétique permettra soit d'activer soit d'inhiber sélectivement les jeunes neurones par application locale de lumière et la microdialyse pourra évaluer les conséquences neurochimiques pendant l'illumination. Pendant cette phase de stimulation ou d'inhibition, les souris seront soumises à un test comportemental neurogenèse-dépendant : le test de l'hypophagie induite par la nouveauté (Novelty suppressed feeding, NSF). Dans ce test, les souris à jeun sont placées dans une enceinte où de l'alimentation est disposée en son centre. Les animaux font face à un dilemme : l'envie de se nourrir et l'anxiété de se rendre au centre de l'enceinte. Le délai à aller se nourrir est dépendant de la stimulation de la neurogenèse adulte hippocampique. Dans un second temps, nous nous attacherons à caractériser l'implication d'une cible pharmacologique neurochimique clé chez les jeunes neurones à savoir le récepteur NMDA du glutamate sélectivement porteur de la sous unité GluN2B. Ainsi, cette sous-unité sera supprimée sélectivement chez les jeunes neurones et les conséquences comportementales et neurochimiques d'un traitement antidépresseur seront évaluées par couplage de la microdialyse et du comportement dans le test du NSF.

Pour l'ensemble de ce projet, 400 animaux seront utilisés. Ce nombre prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux, de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser in vitro ou in silico des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. L'ensemble du projet aura à cœur de conserver les animaux dans un état de confort optimal et pour ce faire des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire. Notre expérience se basera sur deux techniques principales : la microdialyse et les tests comportementaux. Ces techniques présentent l'avantage de générer une quantité de données importante pour chaque animal : la microdialyse permet d'utiliser chaque animal comme son propre témoin.

Enfin, les cerveaux des animaux seront examinés post-mortem afin de valider la localisation des sondes de microdialyse. Ces tissus seront également analysés par immunohistochimie de façon à élucider plus en détails les mécanismes mis en jeu et vont constituer une banque de tissus analysable a posteriori.

Globalement, ce travail permettra une compréhension plus approfondie des conséquences induites par l'augmentation de la neurogenèse adulte hippocampe suite à un traitement aux antidépresseurs. De plus, une étape supplémentaire sera franchie avec l'identification des cibles potentielles pour moduler la circuiterie liée à la neurogenèse adulte hippocampique avec pour objectif final la mise au point de thérapies innovante dans le traitement de la dépression.

**8821** Nos derniers travaux expérimentaux ont montré, dans un modèle animal de rat atteint de syndrome métabolique, que les modulateurs de la voie intracellulaire du GMPc exercent un effet cardiovasculaire protecteur global. Toutefois, l'effet sur l'interaction résistance à l'insuline/dyslipidémie est peu connu jusqu'à présent et reste encore à élucider.

Notre hypothèse est que l'augmentation du taux cellulaire en GMPc pourrait favorablement affecter le développement du syndrome métabolique par limitation de la résistance à l'insuline et les troubles lipidiques, et serait donc une option thérapeutique envisageable pour prévenir le développement de l'athérosclérose et ses conséquences cardiovasculaires.

Les activateurs directs de la Guanylate Cyclase Soluble (GCs) émergent comme une nouvelle classe thérapeutique qui permet l'augmentation du taux basal du GMPc et le rétablissement des fonctions vasculaire et cardiaque. Ce projet sera consacré à évaluer, chez le lapin Watanabe soumis à un régime hypercalorique (RHC), les effets sur les paramètres métaboliques (i.e indices de masse corporelle, de la glycémie, de la résistance à l'insuline) et cardio-vasculaires (i.e inotropie et fonction endothéliale) de l'administration à long terme d'un activateur direct de la GCs et d'un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique (connu pour ses propriétés activatrices de la voie du GMPc).

Par ailleurs, de nombreux travaux de recherche se concentrent actuellement sur le lien entre le microbiote intestinal et le syndrome métabolique. Il a été mis en évidence récemment que le microbiote serait aussi impliqué dans le développement du syndrome métabolique et de ses complications cardiaques et vasculaires. La composition bactérienne de la flore intestinale est fortement influencée par le régime alimentaire. En effet, un régime alimentaire déséquilibré riche en graisses et en sucres aurait pour conséquence, le développement de bactéries pathogènes qui semblent affecter l'équilibre métabolique de l'hôte en modulant la motilité intestinale, l'absorption d'énergie, l'appétit, le métabolisme des lipides et des glucides ainsi que le stockage des graisses. Cette dysbiose intestinale contribuerait à l'insulino-résistance et participerait à l'altération du métabolisme lipidique. Une partie du projet sera donc consacrée à l'étude de la modification du microbiote intestinal associée au syndrome métabolique, développé chez le lapin Watanabe, par analyse des selles, et à l'étude de l'effet de l'administration chronique des traitements pharmacologiques sur la composition du microbiote intestinal.

Cinq groupes de 8 lapins (soit un total de 40) sont disposés comme suit : - 1) un groupe témoin de lapins Watanabe - 2) un groupe de lapins Watanabe soumis à un RHC ; - 3) un groupe de lapins Watanabe soumis à un RHC et traités avec un activateur de la guanylate cyclase (5 mg/kg/j) ; - 4) un groupe de lapins Watanabe soumis à un RHC et traités avec un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique (5 mg/kg/j) ; - 5) un groupe de lapins Watanabe soumis à un RHC et traités avec un activateur de la guanylate cyclase associé à un agoniste  $\beta$ 3-adrénergique. Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le modèle du syndrome métabolique induit par un RHC est désormais maîtrisé dans notre équipe. On ne peut envisager d'étudier exclusivement par des approches *in vitro* sa physiopathologie et les conséquences cardiovasculaires qui lui sont associées. De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique ou *in silico* qui permet d'évaluer l'effet de traitements dans ce domaine. Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude à l'aide d'une grille de score adaptée pour le lapin. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

**8822** Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAS) est une pathologie dont la fréquence est en constante progression car favorisée par l'obésité et le vieillissement de la population. Le SAS est caractérisé par la survenue d'épisodes nocturnes d'apnées répétées responsables des séquences

de déficit transitoire en oxygène appelées hypoxie intermittente (HI). La répétition de ces séquences est reconnue comme à l'origine des effets délétères du SAS sur le système cardiovasculaire.

Par ailleurs des études récentes ont montré que les patients apnéiques présentaient une mortalité par cancer majoré, les cancers du sein, du colon et du poumon faisaient partie des plus représentés. L'objectif de notre étude est de démontrer que l'HI favorise le développement de tumeurs du sein et du poumon, et d'en comprendre les mécanismes dans le but de proposer des approches thérapeutiques novatrices aux patients apnéiques atteints de cancer.

Pour atteindre cet objectif nous réaliserons d'abord une étude sur des cellules issues de tumeurs mammaires et pulmonaires afin d'identifier les voies impliquées. Nous chercherons ensuite à déterminer si des souris exposées à une HI présentent un développement tumoral et une vascularisation accrue. Enfin nous évaluerons l'effet de deux traitements pharmacologiques sur la réduction du développement tumoral. Ceci nous permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse en relation avec l'HI.

Le projet respecte la règle des 3 R :

Remplacement : L'utilisation d'un modèle animal reste essentielle pour étudier l'impact du SAS sur le développement des cancers. Aucune méthode alternative à l'animal n'est possible pour ce type d'étude. Et nous avons prévu d'analyser du tissu tumoral, pulmonaire et du sang.

Réduction : nous utiliserons le nombre minimal de souris pour obtenir des groupes comparables et réaliser des analyses statistiques. De plus, des études sur des cellules tumorales mammaires et pulmonaires seront conduites et permettront de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la compréhension des mécanismes en causes. Au total nous utiliserons 344 souris.

Raffinement : Par ailleurs, le bien-être des animaux sera une priorité tout au long des expérimentations. Les souris seront hébergées dans des conditions minimisant le risque de contamination par des germes pathogènes, afin qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité. Chaque étape expérimentale ainsi que l'euthanasie seront réalisées dans les conditions les plus acceptables possible, en veillant à minimiser au mieux le stress des animaux (Implantations tumorales et éponges, imagerie sous anesthésie gazeuse). La croissance des tumeurs sera étroitement surveillée de façon à ne pas atteindre un stade de développement douloureux.

Notre étude combinera donc des approches cellulaires et animales, couplées à des techniques pointues d'imagerie non invasives du petit animal qui permettront le suivi du développement tumoral, métastatique, le niveau de vascularisation et d'oxygénation tumorale.

L'ensemble de ce travail permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement tumoral et l'invasion métastatique en réponse à une HI similaire à celle retrouvée chez les patients souffrant de SAS dans le but de proposer des approches thérapeutiques innovantes pour les patients apnéiques atteints de cancer du sein ou du poumon.

**8823** TITRE DU PROJET : Evaluation de l'implication de TIMP3 dans l'accumulation du domaine extracellulaire de Notch3 (Notch3ECD) autour des petits vaisseaux, un élément clef dans la pathogénèse du CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy).

(Durée du projet : 1 an et 6 mois)

But du projet : Recherche appliquée et translationnelle.

Les maladies des petits vaisseaux du cerveau (Small Vessels Diseases) sont extrêmement fréquentes, elles sont responsables de 30% des accidents vasculaires cérébraux et contribuent largement au déclin cognitif et au handicap au cours du vieillissement dans la population générale. En dehors de la prise en charge des facteurs de risque vasculaire comme l'hypertension artérielle, il n'existe aucun traitement spécifique de ces affections.

Le CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) est le type le plus fréquent de SVD. Il existe des modèles murins de CADASIL qui ont permis d'apporter des éléments uniques de physiopathologie, maintenant confirmés chez l'homme. On observe ainsi la formation d'agrégats périvasculaires du domaine extracellulaire de la protéine Notch3 (Notch3ECD) avec certaines molécules de la matrice extracellulaire, dont TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3). Ces agrégats précèdent la mise en place de dépôts de matériels granulaires osmiophiles (GOM) visibles en microscopie électronique, et pourraient donc y

contribuer. L'invalidation de TIMP3 améliore le profil clinique des animaux dans un modèle TgNotch3R169C de CADASIL sans affecter la formation et le nombre de dépôts GOM. TIMP3 pourrait donc contribuer également à la maladie.

Dans un modèle murin de CADASIL, il a été montré que la diminution de l'expression de TIMP-3 favorisait le rétablissement de certains paramètres physiologiques comme le débit sanguin cérébral, la pression artérielle et le diamètre passif des petits vaisseaux.

Dans le cadre de notre projet, nous souhaitons nous intéresser plus particulièrement au(x) rôles(s) de TIMP-3 dans la physiologie des petits vaisseaux cérébraux chez la souris. Plus spécifiquement, nous souhaitons définir l'impact de TIMP3 périvasculaire, sur la réactivité des vaisseaux cérébraux. Pour répondre à cette question, nous utiliserons le paradigme de stimulation des vibrisses pour évaluer le couplage neurovasculaire après injection dans le liquide céphalorachidien de la forme recombinante de la protéine TIMP-3.

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

La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine des pathologies neurovasculaires. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. De plus il y a déjà de nombreuses données sur le CADASIL chez la souris, notre projet se situe dans la continuité de ces études.

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié. Nous nous basons sur notre connaissance de la spécificité/sensibilité de nos méthodes pour s'assurer d'utiliser le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité.

Le raffinement de notre protocole et l'utilisation du couplage neurovasculaire comme index fonctionnel contribuent à réduire le nombre d'animaux. Pour la chirurgie, les animaux seront placés sous anesthésie générale profonde induite par isoflurane. Les animaux recevront une injection sous cutanée d'acide tolfénamique (4mg/kg Tolfédine® 40mg/ml) pour prévenir toute douleur occasionnée par la chirurgie avant l'incision de la peau. La Tolfédine® est un anti-inflammatoire, son utilisation permet l'inhibition à la base des voies de signalisation de la douleur.

Au total ce projet utilisera un maximum de 70 souris.

Mots clefs : CADASIL ; Notch3 ; TIMP3 ;

**8824** Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'infarctus du myocarde reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Il est causé par l'apparition d'un caillot dans une artère coronaire qui provoque l'arrêt de la circulation sanguine dans le cœur aboutissant à la mort des cellules cardiaques, notamment par manque d'oxygène. Le traitement de l'infarctus du myocarde consiste à rétablir rapidement la circulation coronaire, que l'on nomme reperfusion, par dissolution du caillot sanguin. Cette reperfusion sanguine est indispensable pour permettre la survie des cellules cardiaques mais, paradoxalement, elle est elle-même potentiellement néfaste. Il est donc essentiel de développer des stratégies de protection du cœur, à associer aux techniques de reperfusion classiquement utilisées pour réduire davantage la mortalité de cette maladie.

Une des causes majeures de la mort des cellules cardiaques lors d'un infarctus du myocarde est un dysfonctionnement de composants des cellules, appelés mitochondries. Ces dernières sont des centrales énergétiques qui utilisent l'oxygène que nous respirons pour produire 90% de l'énergie dont nous avons besoin quotidiennement. Protéger les mitochondries lors de la reperfusion d'un cœur ayant subi un infarctus s'avère donc être une cible thérapeutique majeure.

Notre laboratoire a montré sur des rats que la reperfusion du cœur s'accompagne d'une augmentation très importante de la quantité de cholestérol dans les mitochondries cardiaques. Cette accumulation de cholestérol pourrait être responsable, au moins en partie, du dysfonctionnement des mitochondries évoqué auparavant car nos résultats récents montrent que des stratégies qui limitent cette accumulation, diminuent la sévérité des lésions causées par l'infarctus du myocarde chez le rat. Réduire cette accumulation de cholestérol dans la mitochondrie peut donc constituer une cible intéressante pour limiter les lésions de reperfusion. Pour ce faire, il est important d'en connaître les mécanismes. Cette stratégie serait particulièrement pertinente chez les patients ayant un taux élevé de cholestérol dans le sang (hypercholestérolémie) car ils ont un risque plus important de faire un infarctus du myocarde.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier le(s) mécanisme(s) par lequel(s) le cholestérol s'accumule dans la mitochondrie lors de la reperfusion du cœur après un infarctus en déterminant les protéines impliquées et en analysant les conséquences d'une hypercholestérolémie sur ces phénomènes. Ce projet prévoit donc de mesurer des concentrations de stérols sanguins et mitochondriaux, des fonctions mitochondriales (phosphorylation oxydative et ouverture du mPTP) et d'évaluer des tailles d'infarctus chez des rats normolipidiques (Sprague Dawley), transgéniques (TSPO-/- et CRAC-/-) et hypercholestérolémiques (ZDF). Il n'existe pas, à notre connaissance, de modèle cardiomyocytaire satisfaisant qui nous permette de mesurer ces paramètres in vitro.

Pour ce projet, nous constituerons deux colonies de rats génétiquement modifiés qui n'expriment pas la protéine translocatrice mitochondriale, dont on pense qu'elle peut être impliquée dans le transport du cholestérol dans la mitochondrie. Par ailleurs, nous utiliserons une espèce de rats présentant une hypercholestérolémie chronique couramment utilisée dans les études pré-cliniques. Les rats seront soumis à un modèle expérimental d'infarctus du myocarde, habituellement employée au laboratoire, afin de mimer le plus possible la réalité clinique. Au total, nous utiliserons 258 rats qui seront hébergés dans une animalerie conventionnelle. Ils auront à leur disposition des balles de coton et des feuilles de papier pour jouer/se cacher et des baguettes de bois à ronger et feront l'objet d'une surveillance quotidienne. L'ensemble des procédures sera réalisé chez l'animal profondément anesthésié. Afin de lutter contre la douleur post-opératoire, les animaux recevront une dose d'antalgique dès leur réveil.

**8825** Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France dont l'incidence ne cesse d'augmenter.

En raison de leur grande efficacité, les chimiothérapies sont au cœur des traitements du cancer depuis plusieurs décennies. Ces molécules présentent cependant des effets secondaires majeurs, liés à leur action délétère sur les tissus sains en même temps que sur les tissus cancéreux. De ce fait, les traitements anti-cancéreux ont évolué vers des approches ciblées, soit en utilisant des molécules différentes, comme les anticorps monoclonaux, soit en développant des transporteurs pour les molécules de chimiothérapie permettant de cibler le traitement vers la tumeur en préservant les tissus sains.

Cette étude vise à combiner ces 2 approches en développant une nouvelle formulation de médicament qui incorporera un anticorps monoclonal dans un véhicule afin d'améliorer le ciblage et la spécificité du traitement.

Les anticorps sont des protéines produites naturellement par notre organisme pour le protéger des substances étrangères qui y pénètrent. Une fois accroché sur sa cible, l'anticorps va enclencher un processus de destruction de la cellule ou d'inactivation de la molécule ciblée.

Le Bevacizumab (dont le nom commercial est Avastin) est un anticorps monoclonal déjà utilisé en clinique pour le traitement de différents types de cancers (cancer du côlon, du poumon, du sein, glioblastome, etc.). Il bloque spécifiquement l'angiogenèse de la tumeur, c'est-à-dire qu'il bloque la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins qui alimentent les cellules cancéreuses, réduisant ainsi les possibilités de croissance de la tumeur. Cependant, l'Avastin a aussi de nombreux effets secondaires et les cellules tumorales développent parfois une résistance contre les inhibiteurs de l'angiogenèse.

Nous avons développé une nouvelle formulation du Bevacizumab sous forme de nanoparticules à base d'acide hyaluronique (AH) qui est un matériau naturellement produit par le corps humain afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique du Bevacizumab. L'acide hyaluronique est le ligand naturel de CD44, qui est un récepteur membranaire surexprimé sur les cellules cancéreuses, ce qui permettra un ciblage actif des tumeurs. De plus, il confère aux nanoparticules des propriétés d'invisibilité par rapport au système immunitaire ce qui leur permettra de circuler plus longtemps dans la circulation sanguine, favorisant ainsi une accumulation dans la tumeur.

L'objectif de cette étude est d'évaluer in vivo l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle formulation encapsulant les anticorps et de démontrer une amélioration de l'activité anti-tumorale des nanoparticules d'acide hyaluronique-Bevacizumab par rapport au Bevacizumab libre. Nous avons choisi un modèle non invasif de greffe sous-cutanée de cellules humaines de cancer du sein chez la souris.



Le modèle tumoral chez l'animal permet de reconstituer la complexité de la tumeur dans laquelle on retrouve non seulement des cellules cancéreuses, mais aussi des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules du système immunitaire. Actuellement, cette complexité n'est pas encore complètement reproduite in vitro. Il existe des systèmes 3D qui sont construits avec deux/trois types cellulaires mais ils n'intègrent pas les vaisseaux. C'est pourquoi, pour notre projet il est indispensable de tester cette formulation in vivo car les vaisseaux sont la cible de notre étude.

Après la croissance de la tumeur chez la souris, les formulations seront administrées par voie intraveineuse et la taille de la tumeur sera mesurée.

Une planification statistique minutieuse basée sur des calculs de puissance nous a permis de calculer au plus juste le nombre d'animaux nécessaire pour cette évaluation. Il a été estimé à 78 souris. Le bien-être des animaux sera pris en compte. Les injections seront pratiquées sous anesthésie. Les animaux seront observés tous les jours. L'étude sera stoppée à partir des points limites précoces qui prendront en compte la taille de la tumeur et l'état général de la souris. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress.

**8826** Le projet présenté se décline en différentes procédures qui couvrent les activités de référence et recherche liées à *Trichinella*, un parasite nématode (ver rond) cosmopolite. *Trichinella* infeste tous les mammifères monogastriques (et même certains oiseaux détritivores et charognards). Ce parasite a une distribution cosmopolite et circule principalement dans la faune sauvage. On le retrouve en Europe principalement chez les renards, loups, sangliers et petits rongeurs. *Trichinella* est un agent pathogène responsable d'une zoonose majeure : la trichinellose, classée en danger sanitaire de catégorie 2.

Les larves musculaires de *Trichinella* sont présentes dans les cellules musculaires striées squelettiques de l'hôte infesté et y survivent pendant plusieurs années. Les animaux domestiques (porcs et exceptionnellement les chevaux) se contaminent en consommant des carcasses contaminées (ou déchets alimentaires). L'homme se contamine lui aussi par la consommation d'une viande crue ou peu cuite, voire des produits charcutiers puisque ni la fumaison, ni la salaison ne sont des méthodes assainissantes. Il n'existe pas de traitement contre *Trichinella*, ni de vaccins.

Il est le seul parasite réglementé au plan National, Européen (UE 2015/1375) et mondial (OIE, Codex alimentarius) avec une inspection obligatoire à l'abattoir d'échantillons musculaires pour les espèces sensibles (principalement porcs, chevaux, sangliers) qui permet d'assurer la salubrité des carcasses vis-à-vis du risque de contamination.

Pour ce parasite, les missions de notre laboratoire sont fortement orientées sur des travaux d'appui scientifique et technique (AST) :

- la préparation de matériel de référence (sérum, échantillons calibrés de référence);
- l'organisation d'Essais Inter-Laboratoires d'Aptitude (EILA) pour les laboratoires départementaux agréés et laboratoires privés d'autocontrôle;
- le typage moléculaire d'isolats pour détermination d'espèce;
- la standardisation et la validation de méthode d'analyses;
- recherche appliquée visant l'amélioration des méthodes de détection directe, sérologique et la mise au point de vaccins chez le porc.

Le recours au modèle animal ne peut être remplacé car *Trichinella* ne peut pas se maintenir en culture cellulaire ni être congelé ce qui oblige pour son maintien le passage régulier sur animaux vivants. Notre choix s'est porté sur les souris OF1 ou CD1 femelles. Nous n'effectuons pas de test statistique dans le cadre des procédures 1 à 4 de ce projet, et nous utilisons le nombre minimal mais suffisant d'animaux pour obtenir la quantité attendue de larves parasitaires. Les souris sont ainsi nécessaires au maintien vivant du parasite et à son amplification (Procédure 1) afin de collecter un nombre suffisant de larves. Ces larves sont utilisées pour effectuer les préparations de matériel de référence (Procédures 2 et 3) ou pour l'identification de facteurs de virulence dans le cadre d'essais vaccinaux murins (Procédure 4). Pour la procédure 5, nous utilisons des souris Balb/c afin d'homogénéiser la réponse immunitaire des animaux et réduire de ce fait le nombre d'animaux nécessaire par lot. Le test de Student permet de comparer les lots deux à deux (vaccinés versus témoin) et d'évaluer l'efficacité vaccinale.

Les animaux sont hébergés dans des cages ventilées par lot de 5 ou 10 animaux par cage. Le milieu de vie des animaux est enrichi par des nombreux éléments d'enrichissement comme un mélange de litières différentes, du coton, une plateforme et un igloo avec une roue. Les expériences seront réalisées par des personnes expérimentées et qualifiées afin d'assurer le meilleur confort possible à l'animal et de réduire son stress. De plus, l'infection est asymptomatique chez les rongeurs. Néanmoins, si une complication survenait, l'euthanasie de l'animal sera pratiquée. Le projet présenté utilisera au total 3680 souris.

**8827** Le Retard de Croissance Intra Utérin (RCIU) est une pathologie de la grossesse dont la fréquence et la gravité sont largement sous-estimées. Souvent associé à la prématurité qu'il aggrave, le RCIU, qui peut toucher jusqu'à 10 à 15 % des naissances, est grevé d'une augmentation importante de la mortalité in utero et néonatale. Chez les enfants survivants, le RCIU peut induire des pathologies et handicaps graves, touchant pratiquement tous les systèmes organiques, dont le système respiratoire (détresses respiratoires néonatales), la plupart des organes vitaux (rein, cœur, foie) et, tout particulièrement, la sphère neurologique.

Face à ce problème majeur de santé publique, les moyens d'intervention médicale sont aujourd'hui limités. Même si les hypothèses physiopathologiques sont de plus en plus nombreuses, et pointent en particulier vers un déficit de la fonction placentaire, les mécanismes profonds de la genèse et de la progression du RCIU restent ignorés. De plus, étant plus fragiles, les atteintes inflammatoires sont malheureusement très courantes chez les nouveaux né RCIU.

Afin d'étudier la physiologie des RCIU et la possibilité d'intervenir à l'aide de molécules médicamenteuses, nous utilisons au sein de notre laboratoire un modèle expérimental in vivo de RCIU. Grâce à l'utilisation d'un régime hypoprotidique chez la rate gestante, le modèle mime très bien chez les rats les atteintes retrouvées chez les nouveau-nés RCIU humain (retard de croissance, déficit de maturation des oligodendrocytes, retard de myélinisation, fragilisation des cellules microgliales, problème de connectivité cérébrale.). Plusieurs molécules utilisées in vivo dans le cadre de ce modèle ont déjà donné des améliorations en diminuant les marqueurs de la pathologie et nous aimerions continuer nos expérimentations in vitro afin de mieux comprendre leur fonctionnement, en particulier celui de la carbétocine.

Nous aimerions étudier ce projet sur 5 ans.

Afin de suivre la règle des 3R ce projet comprend :

Plutôt que d'utiliser des techniques in vivo, nous aimerions utiliser des techniques de cultures cellulaires dans le but de comprendre les mécanismes d'action de la carbétocine. Notre étude expérimentale in vitro comprendrait des prélèvements des cerveaux de rats après anesthésie (rats nés de mère ayant subi le régime hypoprotidique et de rats nés de mère contrôles), un tri des cellules cérébrales, puis une mise en culture des microglies et oligodendrocytes qui sont les cellules cibles du modèle.

Par la suite, nous aimerions utiliser les molécules antagonistes de certains récepteurs susceptibles de jouer un rôle dans l'effet de la carbétocine : récepteurs à l'ocytocine, du glutamate, de l'adénosine et des glucocorticoïdes.

- Raffiner : Le modèle de RCIU utilisé est non invasif et repose sur la mise à disposition d'une nourriture hypoprotidique pour les rates gestantes. Les animaux seront particulièrement suivis par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à l'aspect, la mesure du poids et de la quantité de nourriture ingérée (femelles gestantes) et attention à l'aspect et la mesure du poids pour les rats.

- Réduire : pour utiliser le juste nombre d'animaux pour cette étude nous nous sommes basés sur les résultats de nos études antérieures du modèle. Cela nous a permis d'estimer la quantité nécessaire d'animaux par groupe à utiliser (utilisation d'une two way ANOVA pour la comparaison de 4 groupes). De plus, nous désirons faire une étude à la fois sur les microglies et sur les oligodendrocytes qui sont les cellules touchées par le modèle. Pour chaque expérimentation nous effectuerons un double tri afin de récupérer les 2 types cellulaires et diminuer par deux le nombre de rats utilisés.

Le nombre total d'animaux à utiliser pour mener à bien cette étude serait de 936 (864 rats et 72 rates).

**8828** La peau forme la couche externe protectrice du corps, et est composée de deux compartiments le derme et l'épiderme étroitement liés par la présence d'une membrane basale. L'épiderme, qui constitue la couche la plus externe de la peau, est principalement composé de cellules épithéliales, les kératinocytes, qui se maintiennent et se renouvèlent tout au long de la vie grâce à la présence de cellules souches adultes. Ces cellules souches participent activement à la cicatrisation cutanée et restent présentes dans ce compartiment au cours du vieillissement. Ces cellules sont localisées dans une niche spécifique au niveau de la portion permanente du follicule pileux. Ce projet a pour but d'étudier le rôle d'un composant de la matrice extracellulaire dans les mécanismes de régénération cutanée. L'hypothèse de travail sur laquelle repose notre projet est que ce composant de la matrice extracellulaire joue un rôle déterminant en participant à la niche des cellules souches des kératinocytes au cours de l'homéostasie cutanée, mécanisme général de maintien à l'équilibre d'un organe.

Afin de réaliser cette étude nous utiliserons des modèles murins qui reposent sur l'invalidation conditionnelle du gène de la protéine d'intérêt dans la couche basale de l'épiderme ainsi que dans le compartiment des cellules souches du follicule pileux. De par la complémentarité des modèles utilisés et l'utilisation de techniques *in vitro*, quand cela sera possible, notre projet permet d'avoir une vision globale du rôle de ce composant dans la physiopathologie cutanée. Ce projet nous permettra d'évaluer la contribution des signaux matriciels dans l'établissement et le maintien de la niche des cellules souches épidermiques. Ce projet ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche thérapeutique sur la régénération épithéliale suite à de graves brûlures ou des lésions cutanées nécessitant des greffes importantes ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes de vieillissement cutané.

En termes de remplacement, aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture. Cependant, la complexité de la peau, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les animaux transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. En termes de réduction, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été choisi afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le nombre de souris minimum. Une analyse statistique prévisionnelle a été réalisée par simulation Monte Carlo (logiciel Power and Precision V4, NJ, USA) afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque expérimentation en se basant sur la puissance de l'hypothèse nulle. En termes de raffinement, nous utilisons des modèles inductibles qui permettent de diminuer le stress et la souffrance des animaux. Ces modèles permettent un contrôle spatio-temporel de l'expression de la protéine ici la Cre recombinase. De plus, les procédures de cicatrisation et de greffes sont réalisées en présence d'analgésiques afin de minimiser la souffrance. Lors des procédures de greffes chirurgicales, les animaux sont placés sur des tapis chauffants le temps du réveil.

Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 2115.

**8829** Les sous-produits animaux (SPA) constituent une source majeure de protéines très peu exploitée en Europe. En effet, à cause du risque prion, sur les 3 millions de tonnes produites chaque année dans les abattoirs et équarrissages en France, près du tiers est aujourd'hui incinéré et le reste, bien que correspondant à des produits animaux propres à la consommation humaine, reste sous-valorisé sous forme d'engrais ou d'aliments pour animaux de compagnie. Afin de trouver une solution pour valoriser ces sous-produits animaux, nous étudions la possibilité de les utiliser pour nourrir des insectes, qui à leur tour pourront ensuite être incorporés à la nourriture des poissons et des volailles. L'utilisation d'insectes instaure une barrière d'espèce supplémentaire susceptible de limiter la transmission de maladies, et notamment celles dues aux prions.

Pour cela, il reste néanmoins nécessaire d'assurer la sécurité de ces matières vis-à-vis des risques sanitaires, notamment celui du prion. La réglementation européenne considère qu'un traitement est efficace vis-à-vis des prions s'il réduit la charge infectieuse initiale de 99,9999%, soit d'un facteur 1.000.000.

Une nouvelle méthodologie de décontamination du prion reposant sur des conditions douces a été développée en respectant les standards de l'agro-alimentaire. Elle maintient les caractéristiques

nutritionnelles et organoleptiques des sous-produits animaux tout en inactivant les prions : la forme pathologique de la protéine du prion (appelée PrPres), seul marqueur spécifique des maladies à prion, n'est plus détectable par les méthodes biochimiques in vitro, ce qui correspond à une réduction de l'infectiosité initiale d'un facteur mille (au moins).

Ces méthodes in vitro permettent une première sélection des traitements de décontamination potentiellement efficaces, mais elles ne sont pas suffisantes. En effet, elles reposent sur la détection de la PrPres mais pas sur celle de l'infectiosité en tant que telle. Or de nombreuses publications font état d'une possible dissociation entre infectiosité et présence de PrPres. Pour confirmer l'efficacité d'un traitement de décontamination, il est indispensable d'inoculer à un animal de laboratoire un sous-produit animal, contaminé par un prion, ayant subi une décontamination, aucune méthode alternative in vitro pertinente n'existant à l'heure actuelle.

Le bio-essai repose sur la contamination artificielle d'un sous-produit animal avec une quantité connue d'une souche de prion expérimentale. Après traitement de ce sous-produit avec le protocole de décontamination à étudier, celui-ci est inoculé par voie intracérébrale à un rongeur modèle sensible à cette souche de prion. Les animaux sont alors suivis cliniquement et euthanasiés à l'apparition de signes cliniques neurologiques évidents, ou au terme de l'étude (2 ans) pour ceux n'ayant pas développé de signes cliniques. Le diagnostic de maladie à prion est confirmé par examen biochimique. Ce bio-essai permet de déterminer la charge infectieuse présente dans un échantillon infectieux donné.

Une première étude de criblage a permis d'identifier deux traitements, parmi 10 étudiés, qui ont démontré une efficacité 10 à 100 fois supérieure à celle du traitement de référence recommandé par l'OMS (autoclavage à 134°C pendant 18 minutes). Cette étude préliminaire nécessite d'être confirmée par une détermination du titre infectieux résiduel après traitement. Nous proposons de le faire uniquement sur les deux traitements à efficacité prometteuse. Un total de 256 rongeurs, nés et élevés en captivité dans des établissements agréés, sera inclus dans cette étude. Cela correspond au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisamment solides statistiquement.

Les rongeurs, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents spécifiques des maladies à prions ou de signes de souffrance incompatibles avec une survie dans des conditions décentes (perte d'autonomie, douleur ne rétrocedant pas aux traitements analgésiques, mutilation...) qu'ils soient liés ou non à l'inoculation, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrPres sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques pour confirmation du diagnostic clinique établi.

**8830** Ce projet a pour but de tester l'efficacité, la fiabilité et la tolérance d'un dispositif de mesure en continu de la glycémie à destination des personnes diabétiques. Ce dispositif se présente sous la forme d'une montre permettant le calcul de la glycémie en mesurant le glucose dans le liquide interstitiel circulant dans le derme. Afin d'ajuster la technologie, il est indispensable de développer les tests chez l'animal avant de le tester chez l'Homme. Ce projet est initié par une direction scientifique composée notamment de vétérinaires, pharmaciens, chercheurs.

Différents glucomètres existent déjà et permettent un suivi de la glycémie des diabétiques. Cependant, ils sont douloureux, stigmatisants et contraignants. La montre développée, composée entre autre de micro-aiguilles, a pour but une mesure en continu de la glycémie en utilisant un dispositif sans douleur, discret, pratique et compatible avec n'importe quelle activité dont le sport. Il permet une mesure de glycémie rapide, en appuyant simplement sur le bouton de la montre, en toute circonstance.

Pour assurer la réussite de ce projet, les animaux se verront poser un dispositif. Ils devront être isolés pour éviter tout retrait/arrachage du dispositif compromettant l'obtention de résultats. De plus, les animaux pourront présenter :

- une inflammation suite au port prolongé (48 heures) du dispositif
- des infections, suite à la répétition des mesures et donc de la pénétration des micro-aiguilles dans le derme.

Le dispositif a pour finalité d'être utilisé chez l'Homme. Aujourd'hui, il est indispensable de tester ce prototype sur l'animal afin d'assurer une utilisation sûre chez l'Homme. Par ailleurs, il n'existe à ce jour aucune méthode substitutive permettant d'évaluer l'inflammation provoquée par la pose, la fiabilité de la mesure obtenue du taux de glucose dans le liquide interstitiel... Pour tester ce dispositif, nous avons choisi l'espèce porcine car sa peau et son métabolisme sont très similaires à ceux de l'Homme.

Le nombre de porcs utilisés sera d'au maximum 92. Il pourra être divisé par 2 en fonction des résultats obtenus à l'issue des procédures. Pour chaque procédure et chaque test, une hypothèse est établie. A l'issue de ces tests, l'hypothèse est soit acceptée soit refusée. Le nombre d'animaux inclus permet d'obtenir une majorité en faveur de l'une des deux issues possibles et ainsi dégager une tendance. Par ailleurs, afin de réduire le stress et l'angoisse des animaux, une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours sera dispensée avant le début du protocole. Une évaluation de l'acclimatation sera réalisée pour s'assurer du bien être de chacun des animaux. De plus, tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées, optimales et vérifiées quotidiennement. Afin d'augmenter leur bien être, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi. Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

**8831** La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert potentiel dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de l'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques généralement stables et difficilement destructibles. Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité...). Les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) ont impacté significativement certains sols agricoles dans les régions accidentellement ou historiquement contaminées. Ces molécules ont été interdites en France depuis des décennies mais elles sont encore présentes dans les sols pour plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre significatif de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les limites maximales de résidus (LMR) et donc impropres à la consommation.

L'étude du devenir de la chlordécone au cours d'une période de contamination et de décontamination chez les ruminants constitue un enjeu scientifique majeur. Les résultats de l'étude contribueront à la pérennité des systèmes d'élevage antillais et à la protection des consommateurs. Même si des approches de cette nature ont été menées précédemment chez la volaille, aucune donnée n'existe chez les ruminants et en particulier chez l'ovin. Ce projet permettra donc d'affiner les stratégies de décontamination des ovins à travers la détermination des corrélations existantes entre les concentrations de chlordécone et de ses métabolites dans les tissus à différents temps, durant une période de contamination et une période de décontamination.

Afin de mener à bien cette expérimentation, 24 brebis adultes non lactantes, non gestantes et en fin de croissance seront nécessaires. Une période de contamination sera ménagée pendant 90 jours, via l'apport quotidien d'un aliment contaminé à la chlordécone, afin de simuler une exposition environnementale. Par la suite une période de décontamination sera observée pendant 120 jours. Des euthanasies sérieuses lors de ces deux périodes permettront de prélever les tissus étudiés (foie, tissus adipeux, muscle, fèces, sang).

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude, mais les données collectées pourront servir à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la CLD à l'échelle de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 4 apparait cependant nécessaire et suffisant pour l'étude de la réversibilité du Chlordécol en chlordécone, pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les petits ruminants et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement : Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf lors de la pose d'un cathéter et lors des prélèvements de fèces où les brebis seront en boxes individuels sur des périodes de maximum 24h. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. De même des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes collectifs.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière est suffisante. Lors de celles-ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 15% entre deux pesées (une pesée ayant lieu deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abattement profond.

**8832** De nombreux domaines de recherche en toxicologie sur des maladies du foie liées à l'exposition à des contaminants de l'environnement et de l'alimentation (pesticides, résidus de matière plastique) et au mode de vie sédentarisé nécessitent le recours au travail sur animal entier. Pour certaines recherches appliquées en toxicologie, les scientifiques utilisent des animaux porteurs de mutations génétiques et qu'il faut élever en laboratoire car ils ne sont pas commercialisés. Les souris dont il est question dans cette demande portent des mutations sur des gènes important pour le métabolisme du foie, mais dont l'absence ne provoque pas de dommage corporel, et que rien ne permet de différencier d'un animal normal par simple observation. L'utilisation de l'animal vivant est indispensable parce que les molécules qui seront utilisées peuvent avoir une action sur le foie en perturbant d'autres organes (tissus adipeux ou microbiote intestinal par exemple) ce qui est impossible à modéliser par des méthodes alternatives. La stratégie de reproduction utilisée permet de réduire la consanguinité des populations de souris, et d'adapter le nombre d'animaux à ce qui est strictement nécessaire. Les animaux sont hébergés dans des cages de deux à sept individus, et des enrichissements sont disposés dans les cages (maisonnettes en acier inoxydable, filaments de bois et de cellulose). Les animaux sont observés quotidiennement par du personnel qualifié, principalement pendant la période de mise bât des femelles et la période d'allaitement. La demande est ici faite pour une durée de 5 ans car des projets utilisant ces animaux sont prévu pour une durée de 3 ans, mais l'élevage constitue un patrimoine qui sera nécessaire pour des projets futurs, à plus long terme. A raison de 200 souriceaux nés par lignée et par cycle de reproduction au maximum, le nombre d'animaux élevés s'élèvera au plus à 12 500 sur cette période. Cependant, si une lignée n'est plus nécessaire pour des expériences, elle sera conservée par congélation d'embryons. La seule procédure chirurgicale qui sera appliquée aux animaux de l'élevage est une petite biopsie de l'extrémité de la queue afin d'extraire de l'ADN pour vérifier la présence ou l'absence de la mutation. Un demi millimètre de queue suffit pour l'analyse. La queue des animaux est anesthésiée par une pommade à la lidocaïne avant la procédure, puis désinfectée par trempage dans une solution de povidone iodée. L'état des animaux est surveillé pendant la semaine suivant l'intervention afin de vérifier qu'ils ne développent pas d'infection. En cas d'infection, un traitement antibiotique pourra être utilisé, sur avis d'un vétérinaire. Les animaux destinés à l'expérimentation recevront des régimes à teneur en graisse, sucre et/ou acides aminés variable, ou encore contaminés par des pesticides ou des résidus de matière plastique. La comparaison du foie d'animaux normaux avec celui d'animaux génétiquement modifiés permet d'évaluer l'importance du gène étudié dans les dommages produits par les traitements appliqués, et les résultats qui seront publiés dans des revues scientifiques apportent des connaissances sur la maîtrise des risques liés aux molécules étudiées. Ces procédures feront l'objet de demandes d'expérimentation spécifiques.

**8833** La plupart des maladies causant la cécité prennent leur origine au niveau de la rétine. Les recherches conduites ces dernières années ont permis d'identifier certaines causes liées à des pathologies de la

rétine ou à des défauts de communication entre la rétine et le cerveau, et d'identifier les cellules et les gènes impliqués.

L'objectif est de fournir la preuve de concept du mécanisme pour restaurer la vision par thérapie génique chez des patients humains. Pour cela, le modèle animal utilisé est le primate non-humain (macaque *Cynomolgus*) du fait de la proximité structurelle de l'œil avec l'Homme (présence d'une macula contrairement aux autres mammifères).

Afin de remplacer le modèle primate non-humain par une espèce inférieure, des études antérieures ont déjà pu démontrer chez des modèles murins de cécité, que la fonction visuelle pouvait être restaurée par thérapie génique ciblée au niveau de la rétine. Néanmoins la rétine humaine ou de primates non-humains est très différente de la rétine de rongeurs. De plus les vecteurs utilisés pour la thérapie génique n'ont pas les mêmes effets en fonction du modèle utilisé. Il est donc très important de pouvoir confirmer les résultats obtenus précédemment dans des espèces inférieures chez le primate non-humain avant de pouvoir envisager les tester dans les phases cliniques. A ce stade, le recours au modèle primate non humain est donc essentiel.

Dans ce projet, 20 macaques ont déjà été utilisés pour tester 16 vecteurs et vérifier que ces vecteurs ciblent bien les types cellulaires d'intérêt (projet autorisé par le MESRI). A ce stade, il a été démontré que ces vecteurs avaient la capacité de cibler spécifiquement des cellules de manière individuelle ou combinée. La stratégie adoptée est donc validée. Dans cette demande d'avenant, il s'agit maintenant d'optimiser ces vecteurs afin de cibler spécifiquement les cellules d'intérêts et de vérifier que l'expression du gène se fait de manière homogène dans ces types cellulaires, mais également de tester le potentiel d'intégration des cellules souches pluripotentes humaines différenciées en rétine organoïde. Au total, 40 macaques *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) seront utilisés.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, plusieurs vecteurs seront testés sur chaque animal. En termes de raffinement, les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec des programmes d'enrichissement et de socialisation. Les interventions se feront sous anesthésie et sous couverture antalgique.

**8834** Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules immunitaires ont permis l'émergence de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers, y compris le cancer du poumon et le cancer de la peau. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité dû aux mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. L'objectif de ce projet consiste à élucider le rôle anti-tumoral de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques. Notre programme vise à potentialiser les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs et en dopant leurs fonctions cytotoxiques afin d'éliminer toutes les cellules tumorales.

Pour cela nous devons utiliser le modèle murin qui possède la même complexité du système immunitaire que l'Homme. Pour étudier les tumeurs, nous utiliserons le modèle de souris transgénique Ret. Ces souris développent des mélanomes (cancer de la peau) spontanément et sont un modèle au plus proche d'un développement tumoral naturel. Ce modèle murin a déjà été développé. Du fait de leur rôle stratégique au sein de l'immunité dans les modèles infectieux, les lymphocytes mémoires (globules blancs sentinelles) peuvent être un facteur clé du modèle tumoral. En effet, certaines études montrent que des cellules immunitaires sont capables de résider dans les tissus et pourraient retarder la croissance tumorale. Il est donc crucial d'établir des stratégies vaccinales visant à augmenter le nombre de ces cellules au sein des tissus tumoraux. Néanmoins, au vu de nos observations peu de cellules résidentes sont retrouvées dans les tumeurs greffées chez la souris. Ainsi il serait important de tester leur infiltration dans des tumeurs de la peau se développant spontanément, et d'étudier différentes stratégies de vaccins pour déterminer la meilleure voie d'induction de ces cellules. Ce projet représente un enjeu considérable pour le développement d'approche d'immunothérapie visant à éradiquer la tumeur.

L'utilisation des souris est indispensable dans ce projet, car elle permet de voir l'impact des cellules immunitaires résidentes dans un microenvironnement tumoral complexe. De plus le système

immunitaire de la souris est proche de l'Homme, ce qui nous permet d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires antitumoraux et protumoraux.

Ce type d'expérience ne peut se faire *in vitro* car la mécanistique est trop complexe pour reconstruire un microenvironnement adéquat pour le développement des tumeurs et étudier l'interaction du système immunitaire avec la tumeur.

La contrainte pour les animaux sera l'apparition de tumeurs sous-cutanées naturellement (du fait de leur génotype), et les vaccinations par différentes voies (différents animaux) : intra-nasale, sous-cutanée. Des points limite précis seront appliqués en particulier pour limiter à un minimum la taille des tumeurs.

Concernant le protocole expérimental, ces souris seront ainsi vaccinées dès l'apparition de tumeurs avec un lentivirus recombinant codant un antigène tumoral ou avec un vaccin composé d'un peptide et d'un adjuvant. Le suivi des souris ainsi que la réponse immunitaire globale seront caractérisés après plusieurs vaccinations.

Pour la réduction, un maximum de conditions sera réalisé au sein d'une même expérience pour réduire le nombre d'expériences et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés en tant que groupe témoin. Les expérimentations *in vivo* seront aussi réalisées toutes les 6 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenus *in vivo* afin de réduire le nombre d'expériences.

Pour cela nous utiliserons environ 240 souris sur 5 ans. Les souris seront suivies quotidiennement pour vérifier leur bien-être, suivant les règles en vigueur de l'animalerie, ainsi que pour vérifier que les souris n'arrivent pas aux points limites. Toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie générale ou locale (injections). Les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental en tout temps sous forme de cocons et de maisons en carton.

## 8835

Les infections par le parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) sont responsables de diarrhées chez tous les mammifères dont l'importance dépend du statut immunitaire de l'hôte. Ainsi les animaux nouveau-nés et les enfants de moins de 5 ans sont très sensibles à ces infections mais parviennent à éliminer le parasite dès que leur système immunitaire devient plus robuste. En effet, la sensibilité des individus à l'infection par *C. parvum* pendant cette période peut s'expliquer par l'immaturation de l'intestin et du système immunitaire qui lui est associé. Des perturbations au cours de cette période, telles qu'un stress, sont capables d'induire des altérations à long terme de l'équilibre intestinal, associées à une susceptibilité à développer à l'âge adulte des pathologies intestinales.

L'objectif de ce projet est de tester si une infection par *C. parvum* pendant cette période néonatale conduit chez des animaux plus âgés ayant récupéré de l'infection, à des modifications de l'équilibre intestinal. Pour tester cette hypothèse le modèle souris sera utilisé. En effet, les souriceaux développent l'infection et éliminent naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. Des souriceaux âgés de 3 jours sont infectés par voie orale avec le parasite, puis 50 jours après, alors que les souris auront déjà éliminé *C. parvum* depuis 30 jours environ, des analyses immunologiques et transcriptomiques seront réalisées. Par la suite, les animaux seront infectés par un autre pathogène : le parasite nématode, *Heligmosomoides polygyrus bakeri* ou la bactérie *Salmonella Enteritidis*.

Ce projet sera conduit sur 5 ans. Le nombre d'animaux est estimé pour les 5 ans à 500 souriceaux qui deviendront adultes et 100 mères souris adultes (femelles allaitantes) soit environ 600 animaux.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Bien qu'il soit impossible d'ajouter des analgésiques au cours de ces essais puisqu'ils pourraient empêcher le développement des infections, les doses infectantes à l'âge adulte ont au préalable été validées expérimentalement afin de provoquer une infection en limitant les signes de douleur. Pour que les mères souris s'occupent bien de leurs petits en début d'expérimentation, du coton et une boîte à œuf sont introduits dans chaque cage, ainsi la mère fabrique un nid pour sa progéniture.

Réduire : Pour pallier la perte éventuelle de souriceaux due à l'état de stress qui caractérise les souris, plus d'animaux seront mis en reproduction. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole. Par ailleurs, pour les deux modèles d'infection, le sexe de l'animal est compatible avec une « réduction » du nombre d'animaux puisque pour une



meilleure installation du parasite *Heligmosomoides polygyrus bakeri* les mâles seront utilisés et pour *Salmonella Enteritidis*, les femelles sont plus adaptées.

Remplacer : De l'infectiologie ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études in vitro ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires et de l'environnement intestinal (flore bactérienne et antigènes alimentaires).

**8836**

Le système immunitaire défend l'organisme contre des agressions extérieures en étant capable de reconnaître et différencier les constituants de l'organisme et des constituants étrangers (microbe, toxine...). Dans les maladies auto-immunes, il y a un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque par erreur à certains constituants de l'organisme (comme dans le diabète de type 1, la sclérose en plaque ou la polyarthrite rhumatoïde). Dans le cas de la greffe d'organe, le système immunitaire du receveur reconnaît le greffon comme un constituant étranger ce qui peut amener au rejet de la greffe par l'activation du système immunitaire. Les traitements et thérapies actuels contre les maladies auto-immunes ou contre le rejet de greffe ne sont pas spécifiques d'un constituant et ils altèrent l'ensemble du système immunitaire.

Un constituant ciblé par le système immunitaire dans une maladie auto-immune est appelé auto-antigène. La mise en place de traitement capable de réduire spécifiquement la réponse immunitaire contre l'auto-antigène ou contre le greffon est primordiale pour réduire les effets secondaires des traitements actuels et améliorer l'efficacité des thérapies. Une société de biotechnologie a développé un procédé pour rééduquer le système immunitaire à reconnaître les auto-antigènes comme faisant bien partie de l'organisme. Le procédé, dit de « tolérisation », exploite un phénomène naturel qui consiste à accrocher les auto-antigènes aux globules rouges circulant dans l'organisme. Lorsque ces derniers sont naturellement recyclés, les cellules de la rate et du foie indiquent au système immunitaire que les constituants associés aux globules rouges font partie de l'organisme et donc doivent être tolérés.

Ce concept a été validé chez la souris. L'objectif de ce projet est donc maintenant de démontrer l'efficacité de ce procédé dans un modèle primate non humain (PNH), dont le système immunitaire, dans son fonctionnement physiologique et pathologique, est très proche de celui de l'Homme.

Au maximum 40 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. En accord avec la règle des 3R, le projet a pour but d'étudier et caractériser un traitement prophylactique induisant la tolérance immunitaire vis-à-vis d'un antigène et ciblant le foie. Ce type d'évaluation nécessite de disposer d'un modèle expérimental associant les différentes composantes des réponses immunitaires (innées et adaptatives). A ce jour, ces différents éléments ne peuvent être pas être étudiés in vitro puisque la mise en place de la réponse immunitaire et de la tolérance se fait dans différents organes (peau, ganglions, organes lymphoïde secondaire, foie). Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements et injections sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition de tels effets, le vétérinaire de l'installation sera alerté et mettra en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés au minimum par deux dans des modules contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

**8837**

Afin de lutter de plus en plus efficacement contre le cancer, il est nécessaire de faire avancer la recherche dans ce domaine. Le cancer demeure en effet un enjeu de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Rien qu'en France, plus de 385.000 nouveaux cas ont été dénombrés en 2015. Dans ce contexte, l'avènement des thérapies immuno-oncologiques est en passe de bouleverser la prise en charge des cancers. Ainsi, aux côtés de la chirurgie, de la radiothérapie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées basées sur les inhibiteurs de kinases, l'immuno-oncologie est désormais la 5ème approche utilisée dans le traitement des cancers. Contrairement aux autres stratégies thérapeutiques, elle ne cible pas directement la tumeur, mais les cellules du système de défense de

l'organisme. Elle a pour objet de réactiver le système immunitaire du patient afin qu'il élimine les cellules tumorales, comme il le fait en dehors d'un contexte pathologique pour toute cellule anormale. Mais si l'efficacité de l'immuno-oncologie a largement été démontrée en clinique et offre des possibilités de traitement nouvelles pour certains cancers à un stade avancé, il reste un long chemin à parcourir pour trouver une solution thérapeutique pour tous ces cancers. Pour ces tumeurs de stade avancé, la prise en charge des patients est complexe et les possibilités thérapeutiques encore limitées, ce qui fait que le besoin médical en traitements innovants et efficaces est considérable. De ce fait, l'immuno-oncologie est devenue un axe de recherche majeur pour l'industrie pharmaceutique. L'objectif de ce projet est donc l'évaluation sur des modèles murins pertinents de nouvelles thérapies immuno-oncologiques développées par des médecins et des chercheurs ainsi que par les industries du médicament.

La particularité de cette approche, ciblant les cellules du système immunitaire, nécessite des modèles précliniques spécifiques "immuno-compétents" - possédant des cellules immunitaires capables de détruire la tumeur après "réactivation" par ces thérapies innovantes.

Pour cela nous projetons d'utiliser deux types de modèles :

1- Utilisation de modèles de souris immunocompétentes, possédant un système immunitaire fonctionnel, sur lesquelles des tumeurs de souris sont greffées. Dans ce type de modèles, dits syngéniques, où la tumeur est tolérée par le système immunitaire, on peut évaluer l'impact d'un traitement donné sur le système immunitaire et la capacité de ce traitement à lever la tolérance immunitaire envers la tumeur. Les systèmes murins et humains étant suffisamment proche au niveau immunologique pour permettre la translation des résultats pré-cliniques aux résultats cliniques. Ainsi, la validation de cibles thérapeutiques chez la souris peut être transposée à l'homme.

2- Utilisation de modèles de souris humanisées, dans lesquelles un système immunitaire humain est implanté dans une souris porteuse d'une tumeur humaine. L'approche que nous avons choisie est d'injecter des cellules sanguines issues de donneurs sains (PBMC) à des souris très immuno déprimées (absence totale de système immunitaire) porteuses de tumeurs de patients (PDX).

Les greffes de tumeurs humaines xéno greffées sur souris, ou PDX (pour Patient Derived tumor Xenografts), permettent de conserver les caractéristiques de celles-ci à la fois d'un point de vue histologique et moléculaire. Ces modèles sont ceux qui approchent au mieux la complexité des tumeurs humaines, bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de cellules/tissus de souris. Et ces modèles sont aujourd'hui largement utilisés pour la validation pré-clinique de candidats médicaments de type chimiothérapies. Ces modèles associés à un système immunitaire humain sont aujourd'hui nécessaires à la validation de cibles préalablement identifiés dans les modèles syngéniques ainsi qu'à l'évaluation de stratégies combinatoires, comme les associations d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaires, celles d'un inhibiteur spécifique avec une chimiothérapie, ciblée ou non. Il faut également noter que certaines immunothérapies ciblent des molécules qui ne sont pas présentes chez la souris, dans ce cas, seuls les modèles humanisés sont pertinents pour évaluer ces nouvelles approches.

Le projet comporte 4 phases et nécessitera l'utilisation de 2300 souris

1- Validation/caractérisation de 10 modèles syngéniques.

2- Evaluation de traitements dirigés contre de nouvelles cibles thérapeutiques (10 expériences, ou études).

3- Identification de modèles de PDX supportant la présence de cellules immunitaires (10 modèles testés)

4- Evaluation de traitements d'immunothérapie dans des modèles de souris humanisées porteuses de PDX (10 expériences, ou études).

Dans le respect de la règle des 3 R,

1) L'utilisation de ces modèles in vivo permettant l'étude de l'interaction système immunitaire/tumeur ne peut être Remplacé

2) L'analyse des caractéristiques moléculaires des modèles (présence de la cible) permet de ne travailler que sur les modèles qui sont le plus susceptibles de répondre aux thérapies envisagées. De plus, les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés, notamment le taux de prise de greffe, ceci permet de raffiner le projet en n'utilisant que le nombre d'animaux strictement nécessaire.

3) Les animaux seront hébergés en petits effectifs par cage et manipulés dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les cages seront changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (Neslets) pour leur permettre de recréer un environnement proche de leur nid. L'anesthésique administré aux animaux contiendra un analgésique afin de limiter la douleur lors de la greffe. L'état physique et le comportement des animaux seront contrôlés quotidiennement. Toutes les méthodes susceptibles d'éviter ou de réduire les contraintes (douleur ou angoisse) seront appliquées, permettant ainsi de Raffiner les études.

**8838** Les infections nosocomiales sont des infections contractées en milieu hospitalier. 5% des patients accueillis à l'hôpital contractent une infection nosocomiale et 50% de ces infections sont liées à des dispositifs médicaux. Dans l'optique de trouver des solutions efficaces pour combattre ces maladies nosocomiales, des revêtements antimicrobiens ont été développés. Ces revêtements sont constitués de base de polymères naturels polyarginine et acide hyaluronique, qui se greffent facilement sur tous types de surfaces. En utilisant un de ces polymères chargés positivement avec un autre polymère chargé négativement, nous pouvons les déposer en "couche par couche" sur les surfaces. Les polymères peuvent ainsi s'assembler directement sur le dispositif médical. Ces revêtements ont alors des propriétés particulières et notamment se sont révélés in vitro être de puissants antimicrobiens sans présenter de toxicité (tests selon normes ISO10993). Lorsque les bactéries responsables des infections arrivent sur les surfaces, les polymères positifs se collent sur les membranes négatives des bactéries et les détruisent avec une grande efficacité. Après ces tests in vitro, nous souhaitons valider notre technologie in vivo sur un modèle infectieux à *Staphylococcus aureus* chez la souris. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 130 souris dans le respect de la règle des 3R et afin d'établir l'efficacité antimicrobienne de ces implants au cours d'un processus infectieux.

- Remplacement : Nous devons valider si le revêtement est efficace pour éradiquer l'infection du site d'implantation de l'animal avant d'envisager de réaliser les démarches pour des études chez l'Homme. Un modèle in vivo d'implants infectés placés en position sous-cutanée et monitoré jusqu'à 7 jours doit être mis au point. Des modèles in vitro ou in silico ne nous permettraient pas de valider cette hypothèse avant des tests cliniques.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en animalerie A2 en atmosphère contrôlée, à raison de 3 souris par cage, puis en individuelle post-chirurgie, et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Les animaux sont suivis plusieurs fois par jour et pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites. Après la chirurgie, une analgésie post-opératoire sera réalisée par injection de buprénorphine en voie sous-cutanée (0,1mg/Kg) toutes les jours pendant 5 jours.

**8839** But du projet :

Chez l'Homme les anévrismes intracrâniens (AIC) sont des malformations vasculaires du cerveau présentes chez 2 à 5% de la population générale. Les anévrismes sont susceptibles de se rompre avec le temps avec un risque annuel cumulatif moyen d'environ 1%. Ce risque varie d'un patient à un autre selon de nombreux critères, mais reste probabiliste pour un anévrisme donné. La rupture d'un AIC provoque un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) de type hémorragique pour 10/100 000 habitants par an. Plus précisément, la rupture d'un AIC entraîne une hémorragie sous arachnoïdienne (HSA) dont les conséquences peuvent être dramatiques. Malgré les progrès thérapeutiques récents, un épisode d'HSA reste létal dans 65% des cas et cause des séquelles neurologiques graves chez 50% des survivants. En cas de rupture, des traitements efficaces et durables existent et font appel, dans des centres spécialisés, à des stratégies pluridisciplinaires sujettes à recommandations. On retrouve des thrombus dans les sac anévrismaux dans 25% des AIC non rompus et dans 75% des AIC rompus suggérant un rôle moteur des plaquettes dans la pathologie des AIC. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de consensus médical pour le traitement préventif des AIC non rompus,

découvert fortuitement, alors même que les progrès techniques de l'imagerie médicale permettent de révéler de plus en plus d'anévrismes intracrâniens.

Chez ces patients porteurs d'anévrismes pourtant parfaitement asymptomatiques cette découverte laisse planer une menace. Cette menace réelle et/ou ressentie implique une décision médicale cohérente et adaptée au risque de chaque patient. Il n'existe pas de traitement préventif non invasif dans cette pathologie. Seuls les traitements invasifs ont fait preuve de leur efficacité mais sont associés à une morbi-mortalité incompressible (3 à 15 %) parfois supérieure au risque lié à l'évolution de l'anévrisme. Cette absence d'alternative médicamenteuse est le corollaire direct d'un manque de connaissance des mécanismes de formation, de progression, et de rupture des AIC.

L'objectif de ce projet est donc de définir les mécanismes plaquettaires pendant la formation des AIC et de tester différentes stratégies anti-plaquettaires dans un modèle d'AIC chez la souris. Ces stratégies thérapeutiques s'axent sur une investigation en parallèle de la physiopathologie de l'anévrisme intracrânien, via étude morphologique non invasive (IRM). La connaissance approfondie de la physiopathologie qui découlera de ces études nous permettra de tester des substances susceptibles d'interférer favorablement avec l'histoire naturelle de la pathologie. Pour la réalisation de ce projet, nous devrions utiliser environ 300 souris qui résulte du calcul du nombre d'animaux minimum à utiliser pour pouvoir réaliser des analyses statistiques. (Réduction)

Les procédures comportent des gestes de chirurgie qui seront effectués par une personne expérimentée. Les dommages prévisibles sont la douleur post-opératoire qui sera gérée par des anti-douleurs. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et avec analgésie pour maîtriser la douleur post-opératoire, les animaux seront très régulièrement suivis pour surveiller leur confort. Ainsi, les critères de traitement pour soulager l'animal ou les critères d'arrêt définis seront appliqués à temps pour éviter toute souffrance inutile (Raffinement). A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de l'AIC respectant ces exigences de remplacement (utilisation de la culture cellulaire). (3Rs).

Mots clés : Accident Vasculaire Cérébral ; Anévrisme Intracrânien ; Hémorragie sous Arachnoïdiennes ; Plaquettes, Leucocytes

**8840** La Pré-éclampsie (PE) est une pathologie qui touche 5 à 6% des grossesses et qui fait suite à une hypoxie placentaire prolongée au-delà du premier trimestre de la grossesse. La PE est souvent diagnostiquée tardivement suite à l'apparition de complications telles que l'hypertension, œdèmes, éclampsie, retards de croissance intra-utérins. Il est aussi à noter que les femmes qui ont développé une PE ont un risque fortement accru de développer des pathologies cardiovasculaires plus tard.

Au cours de la dernière décennie, les recherches ont démontré l'implication d'un facteur angiogène (facteur favorisant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins), l'EG-VEGF (endocrine gland derived vascular endothelial growth factor) et de ses récepteurs dans le développement de la PE.

Dans une grossesse normale, les niveaux d'EG-VEGF circulants augmentent graduellement avec un pic au premier trimestre puis chutent significativement au deuxième et troisième trimestres. Chez les patientes atteintes de PE, le taux d'EG-VEGF reste élevé au deuxième et au troisième trimestres. De plus, nous avons récemment montré que les taux d'EG-VEGF circulants étaient significativement plus élevés chez les femmes atteintes de PE que chez les femmes non atteintes.

Nous savons que EG-VEGF agit via deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 exprimés par les cellules placentaires. L'objectif de notre étude est de tester l'effet de molécules qui concurrencent EG-VEGF pour interagir avec ses récepteurs (on parle d'antagonistes). Un effet correcteur des symptômes de la PE suite à l'utilisation d'un antagoniste permettra de proposer celui-ci comme molécule thérapeutique de la PE. Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations, importantes pour l'élaboration ultérieure de stratégies thérapeutiques. Le recours à des investigations in vivo est donc indispensable.

Il existe un modèle de souris, forme génétique unique de la PE, la souris STOX13. Dans la PE, la protéine STOX est surexprimée. Le modèle STOX13 exprime 13 fois plus cette protéine et développe la PE.

Les souris seront traitées trois fois durant leur gestation avec l'un des antagonistes. Pendant cette période, elles seront suivies régulièrement afin de déceler les différents signes de développement de la PE. Par exemple, leur pression artérielle sera prise régulièrement, les urines seront collectées pour

analyser le contenu total en protéine (protéinurie), indicateur d'une hypertension. Un groupe de souris sera maintenu au-delà de la mise à bas afin d'étudier le développement de maladies cardiovasculaires (mesure de la pression artérielle, de la protéinurie...) post éclampsie. Au total 810 souris seront utilisées dans le cadre de ce projet.

Exemple de raffinement : Le système EMKA de prise de la pression artérielle à la queue chez la souris. Ce système imposant une immobilisation de l'animal pouvant générer un stress chez la souris, nous l'habitons à rentrer dans le dispositif plusieurs jours avant les prises effectives. Au bout de cette période, les souris rentrent naturellement dans le dispositif. Pour finir, les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi. Le suivi quotidien des animaux hébergés permet de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général) tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**8841** L'hyperplasie congénitale des surrénales est une maladie due à un dysfonctionnement des glandes surrénales, situées au-dessus des reins et qui servent à produire plusieurs hormones essentielles. Héritaire, la maladie est due à des mutations du gène CYP21 qui créent un déficit de l'enzyme surrénalienne 21-hydroxylase (21-OH). Sa fréquence est d'environ 1 cas pour 14000 naissances. Les mutations du gène CYP21 bloquent la synthèse de deux hormones, le cortisol et l'aldostérone. L'hypocortisolémie induite par les mutations stimule l'hypophyse qui pour compenser, fait grossir les surrénales (« hyperplasie »). Mais au lieu de produire cortisol et aldostérone, les surrénales produisent des quantités importantes d'androgènes, qui entraînent une virilisation chronique des personnes de sexe féminin.

Dans les pays développés, la maladie est dépistée systématiquement chez les nouveau-nés. En effet, depuis les années 1950, il existe un traitement qui, démarré précocement, permet de limiter les signes de virilisation et le risque vital qui existe dans certaines formes de la maladie. Il consiste à administrer des hormones de substitution à vie. Ce traitement a de nombreux effets indésirables (obésité, ostéoporose, freinage de la croissance) et n'évite que très imparfaitement la virilisation des organes génitaux, l'hyperpilosité et la masculinisation de la silhouette. Dans les formes sévères de la maladie, des interventions chirurgicales répétées sont nécessaires pour corriger la virilisation du clitoris. Le développement de nouvelles thérapeutiques est donc essentiel.

L'objectif de notre projet pré-clinique est d'étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique qui consisterait à transférer une version fonctionnelle du gène CYP21 dans les surrénales. Si l'expression surrénalienne de CYP21 peut être obtenue et maintenue, elle guérira la maladie définitivement. Il n'est pas possible de tester in vitro ou in silico l'efficacité thérapeutique d'une thérapie génique pour l'hyperplasie congénitale des surrénales. En effet, la validation de la thérapie requiert de corriger un système de régulation à l'échelle d'un organisme vivant, doté des fonctions endocriniennes qui font interagir surrénales et hypophyse en une boucle homéostatique finement réglée. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris et des primates non-humains (PNH).

Nous validerons dans un premier temps les outils de thérapie génique sur des souris sauvages par injection intraveineuse. Toutefois, la très petite taille des surrénales de souris qui ne fabriquent pas exactement les mêmes hormones que l'Homme ne nous permettant pas d'extrapoler directement l'usage de ce vecteur en clinique, c'est pour cela que nous aurons également recours aux PNH.

Du fait de leur proximité physiologique avec l'Homme pour la fonction surrénalienne, de la taille de leurs surrénales ainsi que leur régulation hypophyso-surrénalienne similaire à celle de l'Homme, nous utiliserons les PNH pour l'étude d'expression intrasurrénalienne et de tolérance des vecteurs thérapeutiques porteurs du gène CYP21, par injections intrasurrénales.

Dans un dernier temps, l'effet thérapeutique des vecteurs efficaces chez le PNH sera confirmé sur des souris déficientes en CYP21, modèle de la maladie humaine, qui peuvent être guéries par l'expression surrénalienne du gène CYP21. Nous validerons ainsi leur capacité à guérir la maladie, ce qui ouvrira la voie à l'expression correctrice du gène chez les patients.

Le nombre d'animaux (188 souris et 14 PNH au maximum) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives permettant d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement d'une part et la toxicité potentielle du traitement d'autre part. Notamment, la distribution

des vecteurs et l'expression du gène correcteur seront suivies. Puis, pour le vecteur qui aura la plus grande efficacité à produire 21-OH, ses effets thérapeutiques seront étudiés chez la souris modèle, notamment en suivant la quantité d'hormones dans le sang, le comportement des animaux, ou encore la structure des surrénales.

Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques. Ils seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi en favorisant les interactions sociales. Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie générale, et la douleur peropératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les méthodes expérimentales sont maîtrisées dans le laboratoire et ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions. L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques indolores et non-invasives telles que l'analyse d'urine et des tests comportementaux. Des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques n'auraient pas d'effet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a des signes de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

**8842** Les muqueuses (vaginale et colorectale, du col de l'utérus et également oculaire) et la peau représentent des voies d'entrée d'agents pathogènes provoquant différentes pathologies comme par exemple les maladies sexuellement transmissibles tel que le HIV ou des kératites infectieuses pour les muqueuses, la varicelle ou l'herpès pour la peau. L'exploration des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies ou de la mise en place de la réponse immune de l'hôte dans ces tissus fournit des éléments cruciaux pour proposer des approches vaccinales ou thérapeutiques. Le suivi du compartiment sanguin est pertinent mais insuffisant dans de nombreuses situations. Il est donc nécessaire de mettre au point des techniques pour étudier dans les différentes muqueuses les interactions entre les pathogènes et l'organisme hôte ainsi que la réponse immune de l'organisme à ces infections et aux traitements associés.

Aucun test « in vitro » ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité de la réponse immunitaire à l'échelle de l'organisme entier. Par ailleurs, les outils d'immuno-monitoring développés chez les Primates Non Humain, la susceptibilité de ces derniers aux infections par des agents pathogènes responsables de maladie chez l'homme, en font des modèles de choix (macaques cynomolgus/rhésus infectés par des virus SIV ou SHIV, par exemple). Ces modèles jouent souvent un rôle décisif dans une étape préclinique pour le développement de vaccins ou de traitements thérapeutiques.

Notre équipe a déjà développé des techniques d'exploration de la peau et des muqueuses en imagerie par fluorescence, en utilisant notamment un système d'endomicroscopie confocale. Ces explorations ne sont pas invasives : elles sont réalisées en appliquant la sonde du système de fluorescence à la surface du tissu (aucun signe de douleur n'est observé).

Nous souhaitons désormais progresser dans nos approches d'imagerie par fluorescence sur la peau, les ganglions lymphatiques, les muqueuses colorectales et vaginales, le col de l'utérus et la muqueuse oculaire en utilisant deux types de microscopes : confocal et biphotonique. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 40 animaux (macaques cynomolgus), élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés, afin pouvoir développer des techniques d'imagerie adaptées à chaque tissu en utilisant deux types de microscopes.

Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les différents examens seront réalisés sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés en groupe selon les règles d'hébergement en vigueur dans notre établissement. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien être animal » de l'établissement.

A l'issue de notre étude, ces modèles animaux pourront être impliqués dans d'autres recherches, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés dans des projets scientifiques.

**8843** Les maladies du système nerveux (sclérose latérale amyotrophique (SLA), Parkinson, Alzheimer, Huntington, ...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients.

La SLA est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide, caractérisée par une dégénération des motoneurons de la colonne vertébrale qui conduit à une paralysie progressive fatale. Elle est due à une mutation (anomalie de l'ADN) qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurons de la moelle épinière responsables des mouvements. Notre projet a pour but de développer une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique confidentiel (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur adéno-associé (AAV) par injection intraveineuse ou directement dans le cerveau. Le bénéfice thérapeutique attendu est une amélioration et surtout une préservation des motoneurons dans la moelle épinière et ainsi une amélioration des capacités motrices.

Remplacement : Pour le réaliser, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typique de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de paralysie moteur déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Pour ce faire, nous utiliserons au minimum 2 à 3 modèles de SLA déjà décrit ou en cours de caractérisation par des collaborateurs.

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

Réduction : Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 720 souris réparties en trois groupes et deux types d'injections (intracrâniennes ou intraveineuses). De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

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

**8844** La cryptosporidiose est due à un parasite protozoaire, *Cryptosporidium parvum*, qui est un agent pathogène responsable d'entérites diarrhéiques. C'est une maladie zoonotique (transmissible de l'animal à l'homme et vice-versa) d'importance majeure, de par son impact médical, économique et sociétal. La cryptosporidiose touche particulièrement les jeunes ruminants, et est responsable de diarrhées néonatales, provoquant ainsi des retards de croissance, et des mortalités qui peuvent atteindre les 100% dans certains élevages. Par conséquent, la recherche d'une thérapeutique basée sur l'utilisation des produits naturels est une stratégie dont l'objectif est double : D'une part, elle pourrait limiter les pertes économiques dans les élevages de ruminants, tout en limitant la transmission zoonotique de *Cryptosporidium* à l'Homme ; et d'autre part, elle pourrait constituer une alternative à l'utilisation des antibiotiques, limitant ainsi considérablement les « antibiorésistances ». Le présent projet sera réalisé sur 3 années et vise à évaluer l'efficacité de 4 molécules naturelles contre la cryptosporidiose.

Nous avons choisi de travailler sur 80 chevreaux (40 chevreaux par essai ; 2 essais ; 2 molécules testées par essai). Les animaux sont utilisés à la fois pour confirmer les résultats in vitro et parce qu'ils constituent la future cible du traitement (les jeunes ruminants en général) contre la cryptosporidiose. C'est le modèle le plus utilisé pour tester des traitements destinés aux ruminants contre la cryptosporidiose. Les chevreaux seront infectés expérimentalement par voie orale avec la forme infectante du parasite. Ils seront ensuite séparés en 4 lots de 10 chevreaux : Lot 1 témoin

infecté (les chevreaux ne recevront aucun traitement), Lot 2 & 3 infecté (traitements préventifs 4 heures avant l'infection), Lot 4 : non-infecté et non-traité. Les animaux sont suivis quotidiennement de 2 jours à 30 jours d'âge. L'excrétion des parasites par les animaux sera quantifiée à partir d'un prélèvement fécal. Nous attendons une réduction précoce du taux des parasites excrétés dans les lots infectés et traités, avec moins de symptômes (diarrhée, déshydratation et perte de poids).

La règle des 3R a été respectée comme suit :

Remplacement : Le criblage des molécules d'intérêt a été réalisé en amont de ce projet in vitro. A cette étape du projet, l'efficacité de traitement de la cryptosporidiose nécessite de passer par l'espèce cible.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en permettant d'avoir des résultats interprétables et fiables : une étude statistique a été faite auparavant afin d'ajuster au maximum le nombre de 10 animaux par lot, et donc au maximum 40 chevreaux seront utilisés par essai, ce qui contribue considérablement à la réduction du nombre des animaux à utiliser.

Raffinement : 1). Les animaux seront répartis par lots de 10 individus ce qui leur permet de se retrouver en liberté dans des groupes sociaux. Un espace enrichi permettra aux animaux d'exprimer un répertoire de comportements normaux (structure pour grimper). 2). Les zootechniciens passent quotidiennement afin de faciliter la socialisation des animaux et de prélever les fèces dans de bonnes conditions. Une attention particulière sera mise en place les premiers jours à l'entraînement des chevreaux à l'allaitement artificiel. 3). Les expériences seront réalisées par des personnes expérimentées et qualifiées afin d'éviter toutes fausses manipulations ou un éventuel stress pour les animaux. 4). Si les animaux perdent plus de 10 % du poids normal ou s'ils présentent des diarrhées sanguinolentes pendant plus de 48 heures, un traitement adapté leur sera administré.

Ce projet vise à tester l'activité « anti-cryptosporidienne » de 4 molécules, ce qui nécessitera au maximum 80 chevreaux pour toute la durée du projet (3 ans).

**8845** Les dérèglements métaboliques liés à l'obésité chez la jument est cause de diverses pathologies (fourbures, arthrose, diabète, problèmes de reproduction) impactant le bien être et la reproduction des équidés.

Dans certains cas pathologiques extrêmes, la survie des animaux est menacée.

La jument est un excellent modèle d'étude pour ce sujet car des pathologies équivalentes ont été identifiées chez la femme en réponse aux mêmes causes.

La compréhension de ces dérèglements métaboliques pourrait donc également aboutir à des thérapies en médecine humaine.

Ce projet fait suite à un précédent projet au cours duquel nous avons validé un certains nombres d'indicateurs échographiques et métaboliques traduisant l'engraissement de ponettes Welsh en cours de saison.

L'objectif de ce travail est de comprendre si les changements métaboliques observés pendant la phase de croissance du tissu adipeux mesurée par échographie, sont engendrés par le caractère qualitatif et/ou seulement quantitatif de la ration alimentaire.

Dans un premier temps (de novembre 2017 à mars 2018), nous nous proposons de suivre la décroissance des indicateurs métaboliques pendant l'hiver sur un lot de 20 ponettes Welsh sélectionnées pour leur croissance significative en tissu adipeux cette année.

Lors de la phase printemps/été suivante (du mois d'avril au mois de juillet 2018), les ponettes suivies pendant l'hiver seront séparées en deux groupes qui subiront des conduites nutritionnelles qualitativement différentes mais énergétiquement équivalentes : un lot de 10 ponettes sera maintenu au box avec un régime paille / concentré, un lot de 10 ponettes sera placé en pâture. La variation des profils métaboliques sera suivie au cours de la prise d'état des animaux.

Réduction : Les deux lots de 10 ponettes (n=20) doivent nous permettre de mettre statistiquement en évidence les changements qualitatifs et quantitatifs engendrés par les deux conduites.

Raffinement : un soin particulier a été porté à ce projet afin de réduire l'invasivité du protocole. Le suivi des variations métaboliques des animaux sera exclusivement réalisé à partir de prélèvements sanguins réalisés par les animaliers du pôle équin maîtrisant parfaitement ce geste technique. Les biopsies de tissu adipeux réalisées au cours du protocole précédent ne seront pas effectuées au cours de cette étude.



Remplacement : La ponette Welsh est un excellent modèle pour l'étude de cette problématique car la richesse de nos prairies qui ne correspond pas aux conditions environnementales difficiles auxquelles cette race d'équidé est adaptée, induit chaque année diverses pathologies liées à l'obésité des juments (fourbures, arthrose, diabète, bouleversements métaboliques importants). Cette expérimentation nécessite un suivi précis des consommations nutritionnelles individuelles des animaux, elle ne peut pas à ce jour être simulée informatiquement.

**8846** Un produit d'intérêt (X) va être utilisé dans un protocole clinique de thérapie cellulaire en tant que réactif dans une culture de progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques. Au bout de 7 jours de culture, les cellules ont été cultivées en présence du produit X avant d'être injectées à des patients. Ces cellules vont être utilisées comme médicament de thérapie cellulaire pour traiter le cancer lymphoïde humain. Comme il n'a jamais été utilisé dans un essai clinique, il est nécessaire d'évaluer son potentiel de tumorigénicité dans un modèle murin.

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

La dose du produit de thérapie cellulaire injectée chez la souris correspond à 5 à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

L'objectif principal de l'étude est d'évaluer le potentiel de tumorigénicité des cellules d'intérêt administrées par voie intraveineuse à des souris, afin de disposer de données de sécurité pour démarrer le développement clinique des cellules souches hématopoïétiques cultivées en présence du produit d'intérêt.

La dose de cellules testée correspond à 5 à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

Au total, 20 souris immunodéprimées seront utilisées :

- Groupe 1 : 5M/5F de 3 semaines injectés avec 100 µL de solution contrôle

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

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

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

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

Respect de la règle des 3Rs :

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

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

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

**8847** La thérapie génique bénéficie d'avancées considérables dans le domaine des biotechnologies. Ces thérapies consistent le plus souvent à introduire un (ou des) gène dans les cellules d'un organisme pour y corriger une anomalie, comme une mutation, à l'origine d'une pathologie. En général, il s'agit d'un gène normal et fonctionnel qui restaure la fonction du gène présent mais altéré à l'origine de la maladie. Le gène "correcteur" est introduit (transduction) dans les cellules du patient grâce à un vecteur viral, c'est-à-dire un virus qui n'a plus de pouvoir pathogène. Actuellement, les vecteurs les plus efficaces sont des adénovirus (AAV), notamment parce qu'ils ont un fort potentiel de transduction in vivo et sont particulièrement sûrs du point de vue biosécurité. De plus, il existe plusieurs types d'adénovirus, qui permettraient de cibler différents types cellulaires.

Le cerveau est un organe cible très étudié dans le cadre de la thérapie génique car il est le siège de nombreuses pathologies aujourd'hui sans solutions thérapeutiques, et donc en attente de nouvelles stratégies de soins. Il a de plus été montré que les vecteurs adénovirus permettent de transduire de manière très efficace les différentes cellules cérébrales et les neurones en particulier. De ce fait, de nombreux projets de thérapie génique ciblant des maladies neurodégénératives sont actuellement

en phase d'étude clinique ou pré-clinique. Il est donc crucial de déterminer le devenir des vecteurs adénovirus dans l'organisme après leur administration.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau et en particulier les barrières cellulaires qui définissent ces différents compartiments.

L'objectif de ce projet est de déterminer la biodistribution et l'efficacité de transduction de différents vecteurs adénovirus après administration par voie intraveineuse ou injection intracérébrale dans le parenchyme ou le liquide-céphalo-rachidien (LCR), chez le macaque cynomolgus. Ces paramètres seront mesurés in vivo dans les fluides biologiques (sang, urine et LCR) puis dans les tissus. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés dans cette étude, nous avons conçu des vecteurs qui seront facilement différenciables par des techniques d'histologie et de biologie moléculaire. Il sera ainsi possible de tester plusieurs types d'adénovirus sur le même sujet.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité en provenance d'élevages reconnus. Ce projet utilisera entre 18 et 42 primates au maximum. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien être des animaux.

**8848** L'athérosclérose, caractérisée par la formation d'une plaque d'athérome à l'intérieur de la paroi des vaisseaux sanguins, est un problème de santé publique dans les pays développés. La rupture brutale d'une plaque peut entraîner un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral. On sait que certaines pathologies chroniques accélèrent la formation de la plaque d'athérome comme le diabète ou l'insuffisance rénale. Des phénomènes locaux peuvent favoriser la rupture, tels que l'inflammation ou la formation de micro-calcifications (ce qu'on appelle le phénomène de minéralisation de la plaque). Il est donc important de disposer d'outils diagnostiques permettant d'identifier ces micro-calcifications.

Plusieurs techniques d'imagerie sont disponibles pour visualiser les calcifications vasculaires, allant de la simple radiographie à la tomодensitométrie (TDM) (ou scanner à rayons X). Les performances de ces examens d'imagerie sont variables. Grâce à une plus grande compréhension à la fois du phénomène de minéralisation et des conséquences cliniques de la calcification vasculaire, des stratégies thérapeutiques futures pourront être plus efficacement conçues et appliquées.

L'imagerie moléculaire a été proposée récemment pour mettre en évidence les processus de formation de la plaque. Cette technique utilise un médicament faiblement radioactif (le  $^{18}\text{F}$ -NaF) qui va s'incorporer dans les micro-calcifications qui deviennent alors visibles grâce à l'utilisation d'un appareil d'imagerie extrêmement sensible appelé Tomographie par Emission de Positons (TEP). Le  $^{18}\text{F}$ -NaF est un médicament radiopharmaceutique qui a été initialement approuvé pour l'imagerie du squelette. Il détecte les zones de formation ou de remodelage osseux. Chez l'homme, cette imagerie est utilisée pour l'évaluation des cancers des os primitifs ou secondaires. D'après les informations que nous avons, l'incorporation du  $^{18}\text{F}$ -NaF au niveau vasculaire et valvulaire reflète l'activité de minéralisation. Il permettrait ainsi de détecter un athérome avant qu'il ne soit apparent au scanner.

Lors de ce projet nous allons étudier deux modèles murins transgéniques. Le premier modèle est un modèle de souris double déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (Apo $^{-/-}$ ). Ces animaux sont caractérisés par un processus d'athérosclérose accentué. Nous réaliserons chez ces animaux une procédure chirurgicale en vue de leur provoquer une insuffisance rénale. Cette procédure repose sur deux chirurgies successives. Une première à 8 semaines d'âge au cours de laquelle des lésions corticales sur le rein droit sont réalisées et deux semaines plus tard une néphrectomie du rein gauche. Ceci va induire l'insuffisance rénale catalyseur du processus d'athérosclérose. Chez ces animaux (lot 3, n=10) donc nous étudierons l'apparition de calcifications vasculaires au niveau aortique.

Le second modèle est un modèle de remodelage au niveau de la valve aortique. Il repose sur l'utilisation d'animaux génétiquement modifié au niveau du gène de l'Epithelial Growth Factor Receptor (Egfr) on parle de souris Egfrwa2/wa2 (lot 4, n=10). Ces animaux vont développer un remodelage au niveau de la valve aortique suite un défaut de développement cardiaque.

Les données contrôles pour ce projet seront celles obtenues de l'étude de 10 souris ApoE<sup>-/-</sup> naïves (lot 2) donc sans provocation d'insuffisance rénale et 10 souris C57Bl6 (lot 1). Dans un souci de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés durant ce projet, les données obtenues chez les animaux Egrwa2/wa2 seront comparées avec les données de ces deux lots contrôles. Nous sommes contraints d'utiliser des modèles animaux transgéniques (ApoE<sup>-/-</sup> et Egrwa2/wa2) puisqu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de modèles in vitro d'athérosclérose. Le modèle ApoE<sup>-/-</sup> insuffisant rénal est un modèle bien décrit et qui permet de réduire le temps d'utilisation des animaux. En effet la néphrectomie accélère le processus d'athérosclérose, ce qui permet d'utiliser les animaux plus rapidement et ainsi éviter toute souffrance à la suite du vieillissement de l'animal malade. Un nombre de total de 40 animaux sera suffisant pour obtenir des résultats permettant une analyse statistique fiable. En plus de ces 40 animaux, nous allons inclure 20 souris SWISS pour toutes les expérimentations de mise en place et de calibration des différents appareillages.

Toutes les procédures s'effectuent sous anesthésie profonde des animaux durant toute la durée de l'expérimentation. La gestion de la douleur est réalisée de façon systématique par des dérivés morphiniques.

Les effectifs déterminés sont suffisants pour autoriser une analyse statistique. Tout d'abord nous étudierons la distribution de nos variables par un test de normalité ( $n < 50$  : test de Shapiro-Wilk). Si la distribution est normale nous pourrions alors utiliser un test paramétrique (test t des écarts). Si la distribution n'est pas normale, nous utiliserons un test non paramétrique (test de Wilcoxon pour séries appariées – test des rangs signés). Les comparaisons intergroupe (souris insuffisantes rénales vs souris contrôles) seront effectuées par des tests non appariés.

**8849** pgbd5 est un des gènes les plus conservés chez tous les vertébrés mais dont on ne connaît pas la fonction physiologique. Cependant son expression dans le cerveau suggère qu'il aurait un rôle important dans la mémorisation. Aucune invalidation par mutation naturelle n'a à ce jour été localisée chez les vertébrés.

L'objectif du projet est de générer des souris présentant une invalidation du gène pgbd5 spécifiquement dans le système nerveux central (SNC) en utilisant le système cre-loxP puis d'évaluer les conséquences phénotypiques de l'invalidation du gène sur le développement et le comportement des souris. Le gène pgbd5 sera invalidé dans quatre régions du SNC en utilisant 4 lignées de souris exprimant spécifiquement la recombinaison cre dans ces régions. Les souris invalidées homozygotes de chaque sexe et des souris témoins de chaque sexe seront phénotypées sur leur état clinique.

En conformité avec la règle des 3R, les animaux sont hébergés selon la réglementation en vigueur. Il est nécessaire d'utiliser des animaux pour étudier ce déterminant génétique de la mémorisation car aucune méthode alternative n'existe.

Pour détecter des différences de 20% sur des caractéristiques quantifiables comme le poids avec un test t de Student d'une puissance de 80%, il a été calculé qu'un effectif de 10 souris invalidées homozygotes de chaque sexe et des souris témoins de chaque sexe devront être phénotypées sur leur état clinique. Au total 40 souris seront testées par système d'invalidation, soit 160 souris pour les quatre systèmes utilisés. L'apparence physique des animaux sera suivie de façon hebdomadaire : i) aspect du pelage, ii) écoulement nasal/oculaire, iii) état de la queue, iv) posture, v) boiteries. Le comportement en cage d'élevage sera suivi de façon hebdomadaire : i) plaies et automutilation, ii) ataxie et mobilité.

**8850** Les plaquettes jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Elles sont également impliquées dans la thrombose artérielle. Suite à la rupture d'une plaque athéromateuse dans une artère malade, les plaquettes adhèrent au site de lésion, s'activent et agrègent. Elles forment un thrombus mural qui peut bloquer l'écoulement du sang et entraîner des pathologies ischémiques graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde. Comprendre les mécanismes qui régulent l'adhésion et l'activation des plaquettes permet d'identifier de nouvelles cibles anti-thrombotiques.

Les plaquettes expriment la tetraspanine CD151, dont le rôle dans les fonctions plaquettaires reste encore mal connu. L'objectif de ce projet vise à caractériser le rôle de ce récepteur dans les fonctions

d'adhérence et d'activation des plaquettes. Ceci permettra de déterminer si CD151 pourrait constituer une potentielle cible anti-thrombotique

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de CD151 dans les fonctions des plaquettes. Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires dépourvus de noyaux. Elles ne peuvent pas être cultivées et ne sont pas substituables. Les techniques de génie génétique ont permis de modifier à façon le génome de la souris ce qui nous a permis d'avoir à notre disposition un modèle murin qui présente un déficit plaquettaire de la tetraspanine CD151, nécessaire à notre étude.

Réduction

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum en évaluant le plus de fonction possible dans un même test expérimental, avec cependant la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement

Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec du coton compressé et de la frisure pour permettre aux souris de construire leurs nids. Elles pourront ainsi compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont mis entre 2 et 6 par cage afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence des changes avec le stress y afférant. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront faites avec des animaux anesthésiés et traités contre la douleur.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 720 souris.

**8851** Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales de pronostic très défavorable. Les traitements actuels reposent sur une chirurgie associée à de la radiothérapie (RT) et de la chimiothérapie. Malgré ce traitement, la médiane de survie des patients ne dépasse pas 15 mois. Il est donc primordial d'optimiser ces stratégies thérapeutiques. C'est dans cette optique que s'inscrit ce projet de recherche. Les données de la littérature suggèrent que HIF-1 et HIF-2 sont impliqués dans le développement tumoral et dans la réponse à la radiothérapie. Récemment, le facteur HAF a été identifié comme induisant la dégradation de HIF-1 mais s'associant à HIF-2 pour induire ses gènes cibles. Nous avons modifié génétiquement des cellules de GB afin d'inhiber l'expression de HAF, HIF-1 ou HIF-2 et souhaitons comparer les effets de ces inhibitions sur la croissance de tumeurs orthotopiques et leurs réponses aux rayons X. Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Le remplacement n'est pas possible. En effet, le recours à des animaux est justifié par la nécessité d'étudier le développement tumoral en tenant compte de tous les aspects de son microenvironnement (inflammation, hypoxie, vascularisation) dans un organe spécifique (cerveau) et d'un organisme entier. L'utilisation de souris Nude permet de développer des modèles de xénogreffes se rapprochant au mieux de la réalité clinique (animaux immunodéprimés hôtes des cellules humaines pour éviter toute réaction de rejet). Concernant la réduction du nombre final d'animaux strictement nécessaire, ce nombre a été calculé afin d'assurer un nombre minimal compatible avec une puissance statistique des résultats optimale. Les animaux (176) seront utilisés pour un projet de 5 ans. Concernant le raffinement, toutes les dispositions seront prises afin de réduire au maximum la souffrance et le stress de l'animal et suivre des consignes de raffinement. Ces animaux seront hébergés en portoirs ventilés afin de réduire toute contamination. Ces portoirs sont régulés en hygrométrie et température et en cycle jour/nuit. Ce mode de stabulation permet de réduire le nombre de changes des animaux et donc limite le stress lié au change. Pour réduire les sources de contamination et les bruits intempestifs, ces portoirs sont disposés dans une animalerie L2 à accès contrôlé. Les examens d'imagerie pour ces animaux sont non invasifs et les procédures menées dans ce projet se réalisent sous anesthésie générale et contrôle de température. L'anesthésique (isoflurane) a été retenu car il présente le moins d'effets sur le taux tissulaire d'oxygène. De plus, une anesthésie locale est appliquée au niveau de la suture cutanée. En péri-opératoire, l'analgésie est assurée par injection de buprénorphine 15 min avant le réveil de l'animal répétée si besoin 12-24h post-chirurgie. Une surveillance postopératoire est effectuée tous les jours par du personnel formé, visant à vérifier des signes de souffrance. Les animaux sont pesés tous les jours. Si l'apparition de

signes de critères d'euthanasie s'avèrent, l'euthanasie est prévue, en adéquation par rapport à l'espèce et au poids et se fait sous anesthésie profonde.

8852

La complexité du système immunitaire innée du poumon qui comprend des éléments très variés, à la fois anatomique (tapis mucociliaire par exemple), biologique (peptides antimicrobiens), cellulaires (macrophages alvéolaires), vasculaire (recrutement de polynucléaires neutrophiles) rend difficile une approche ex vivo ou in vitro (sur culture cellulaire par exemple) pour appréhender la défense antimicrobienne pulmonaire dans sa globalité. De même, l'évaluation de stratégies préventives ou thérapeutiques, après des étapes in vitro, nécessite in fine, une évaluation sur organe entier.

La souris et le rat sont des animaux vertébrés vivants dont l'anatomie pulmonaire et l'immunité innée sont proches de celles de l'homme, ce qui permet l'étude de la physiopathologie des infections respiratoires.

Les principaux objectifs seront d'analyser la physiopathologie des pneumonies dues à des germes hospitaliers en se focalisant notamment sur les facteurs bactériens de virulence d'*Escherichia coli*, d'autres entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*), de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. Différentes méthodes seront utilisées afin d'individualiser les principaux gènes impliqués dans la virulence bactérienne au sein des voies respiratoires et du parenchyme pulmonaire avec comme but ultime de découvrir de nouvelles cibles préventives ou thérapeutiques de ces infections sévères. Une vision globale sur l'ensemble du génome bactérien sera obtenue par une méthode impliquant du séquençage haut débit d'une librairie de mutants par transposon. Dans un second temps, les facteurs bactériens les plus impliqués dans la virulence au sein des poumons et parallèlement accessibles comme cible thérapeutique (protéine extramembranaire, toxine, etc...) seront individuellement étudiés afin de confirmer l'impact de leur délétion et leur rôle propre dans la pathogénie de l'infection pulmonaire. Le projet global nécessitera l'utilisation d'environ 150 rats et 900 souris.

Le projet expérimental est conforme aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement (« règle des 3 R »). En effet :

Réduction. Malgré les nombreuses souches bactériennes (mutants) et les différentes espèces bactériennes qu'il faut évaluer afin d'identifier les facteurs bactériens communs potentiels cibles de nouvelles thérapeutiques, nous prévoyons de réaliser un nombre réduit d'animaux contrôles à chaque expérience. Nous prévoyons aussi de normaliser les comptes bactériens par la transformation logarithmique afin de gagner en puissance statistique et donc éviter des expérimentations animales non concluantes.

Raffinement. Le raffinement est obtenu grâce au respect d'un délai d'au moins 48-72h entre l'arrivée des souris au laboratoire et le début de l'expérimentation animale, le respect des conditions optimales d'hébergement des souris (2 à 5 souris par cage), la maîtrise de l'anesthésie au cours de l'expérience. Après livraison à l'animalerie, les souris sont hébergées en cage (au maximum 5 souris par cage) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le maintien dans ces conditions est assuré au minimum 48h avant toute manipulation. Pour la réalisation de l'infection pulmonaire, les souris sont sédâtées par un protocole validé et publié (xylazine + ketamine en injection intrapéritonéale). Après obtention d'une sédation profonde, l'inoculum est déposé dans les narines pour favoriser l'inhalation bactérienne, puis les souris sont maintenues sous une lampe chauffante pour assurer le maintien de la température corporelle. Au réveil, elles sont remises en cage avec une surveillance régulière (toutes les 6 à 12h) afin d'identifier précocement les souris moribondes et éviter toute souffrance inutile. En fin d'expérience, les souris sont euthanasiées par injection intrapéritonéale létale de penthotal, puis, après disparition de la ventilation spontanée, elles sont élinguées afin de s'assurer du décès et donc de l'absence de souffrance lors du prélèvement des échantillons.

Remplacement. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle cellulaire ou in vitro permettant la modélisation d'un processus aussi complexe qu'une infection pulmonaire dont l'interaction entre l'ensemble du système immunitaire de l'hôte et les bactéries à un rôle primordial. Aucun système in vivo ne peut à ce jour mimer cette interaction multiple.

Enfin, l'objectif final sera de développer des méthodes préventives ou curatives afin de limiter la morbi-mortalité significative de ces infections.

**8853** Le but de ce projet est de valider un nouveau système d'administration d'agents thérapeutiques qui permettrait un ciblage spécifique des cellules malades du patient sans affecter ses cellules normales. Il est basé sur l'encapsulation de l'agent thérapeutique dans une nano-émulsion (NE), c'est-à-dire dans un mélange à base de lipide et de surfactant.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses luminescente seront injectées chez des souris, qui seront traitées par des nano-émulsions contenant ou non un agent thérapeutique. L'efficacité sera évaluée par l'impact du traitement sur la croissance tumorale et la formation de métastases, en utilisant un système d'imagerie dédié au petit animal.

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. De plus il utilise un système d'imagerie du petit animal (IVIS Illumina LT) qui permet un suivi longitudinal d'un même animal donc une réduction du nombre total nécessaire. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner :

Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et de balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (kétoprofène 1%, à raison de 15µl/10g de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement :

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire in vitro la cascade d'évènements qui sont analysés ici.

650 souris seront utilisées dans ce projet

**8854** L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est la maladie la plus fréquente de l'homme âgé (90 % d'atteintes histologiques chez les sujets de 80 ans). Elle rassemble au plan histologique, une prolifération à la fois épithéliale et stromale du tissu de la zone transitionnelle de la prostate. Au plan clinique, elle se manifeste par des troubles urinaires du bas appareil urinaire. La pathogénèse de l'HBP n'est pas entièrement élucidée. Ce développement débute vers la quatrième décennie pour ne devenir macroscopique que vers la sixième ou septième décennie, c'est-à-dire chez le sujet âgé. Pour ce qui concerne l'épidémiologie, diverses études internationales ont montré des prévalences variées, néanmoins, toutes montrent une augmentation avec l'âge, et des extrêmes de 12 % à 25 % pour des symptômes modérés, et de 2 % à 6 % pour les symptômes sévères. Les patients ayant une HBP symptomatique qui ne relèvent ni de la simple surveillance, ni d'un traitement chirurgical, sont candidats à un traitement pharmacologique. Quatre classes thérapeutiques peuvent être utilisées dans le traitement de l'HBP : les alpha-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme 5-alpha réductase, les anticholinergiques et la phytothérapie. Toutefois, l'efficacité de ces traitements est assez limitée et en plus associée à de nombreux effets secondaires, à l'exception de la phytothérapie. Il y a donc une forte demande de la part des patients et des urologues pour tester de nouveaux traitements qui soient plus efficaces et ayant très peu d'effets indésirables.

Le but de notre étude est de quantifier l'effet chronique de molécules ayant des mécanismes d'actions différents sur l'hypertrophie bénigne de la prostate et l'inflammation des différents lobes de la prostate de souris. Entant donné la complexité des mécanismes biologiques, encore mal connus, qui sont responsables de la prolifération du stroma de la prostate, l'étude ne peut se faire que sur des animaux vivants. En effet, il n'y a pas de modèles in vitro, car les facteurs biologiques responsables de la croissance prostatique sont encore mal connus. Le but de ce projet est de tester des médicaments déjà connus ainsi que de nouvelles molécules dans un modèle expérimental d'HBP chez la souris en utilisant cinq groupes expérimentaux (n=13 par groupe soit 65 souris). Le modèle de souris

transgénique dénommé Probasin-Prolactine (Pb-PRL) présente plusieurs caractéristiques communes avec l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) et à ce titre, il a déjà été utilisé afin de tester l'effet de composés pharmaceutiques, phytothérapeutiques et environnementaux sur l'évolution de la pathologie prostatique de ce modèle animal. Ce modèle expérimental mime la pathologie humaine à la différence d'autres modèles couramment utilisés, en particulier chez le rat, le lapin ou le chien. Afin de tester les dysfonctions urinaires secondaires à l'hypertrophie prostatique, les souris mâles homozygotes, âgées de 6 mois, seront placées dans des cages métaboliques pendant 24 heures. Ces cages sont conçues de façon à laisser passer les urines en bloquant totalement les fèces. Cela nous permettra de tester l'effet des candidats médicament sur les mictions pendant la phase active (la nuit) et la phase de repos (le jour). Ce système non-invasif pour le test de la fonction vésicale représente un gros avantage par rapport aux protocoles expérimentaux utilisés couramment. Notre protocole expérimental respecte donc le principe des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux (car les souris peuvent être testé plusieurs fois dans la cage métabolique), le remplacement et le raffinement car nous utiliseront un modèle non-invasif, qui réduit fortement la souffrance animale.

**8855** L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est la maladie la plus fréquente de l'homme âgé (90 % d'atteintes histologiques chez les sujets de 80 ans). Au plan clinique, elle se manifeste par des troubles urinaires du bas appareil urinaire. La pathogénèse de l'HBP n'est pas entièrement élucidée. Ce développement débute vers la quatrième décennie pour ne devenir macroscopique que vers la sixième ou septième décennie, c'est-à-dire chez le sujet âgé. Pour ce qui concerne l'épidémiologie, diverses études internationales ont montré des prévalences variées, néanmoins, toutes montrent une augmentation avec l'âge, et des extrêmes de 12 % à 25 % pour des symptômes modérés, et de 2 % à 6 % pour les symptômes sévères. Les patients ayant une HBP symptomatique qui ne relève ni de la simple surveillance, ni d'un traitement chirurgical, sont candidats à un traitement pharmacologique. Quatre classes thérapeutiques peuvent être utilisées dans le traitement de l'HBP dont la phytothérapie. Toutefois, l'efficacité de ces traitements est assez limitée et en plus associée à de nombreux effets secondaires, à l'exception de la phytothérapie. Il y a donc une forte demande de la part des patients et des urologues pour tester de nouveaux traitements qui soient plus efficaces et ayant très peu d'effets indésirables.

Le but de ce projet est de tester des médicaments déjà connus ainsi que de nouvelles molécules dans un modèle expérimental d'HBP chez la souris. Des souris mâles adultes seront traitées pendant 12 semaines par une combinaison de différentes hormones sexuelles. Plusieurs études ont montré que les souris ayant reçu ce type de traitement chronique sont caractérisées par une hypertrophie prostatique importante, une obstruction urétrale, une rétention urinaire et une augmentation de la fréquence de mictions. Ce modèle expérimental mime donc la pathologie humaine à la différence d'autres modèles couramment utilisés, en particulier chez le rat, le lapin ou le chien. Afin d'étudier les effets in vivo des candidats médicaments pour l'HBP ce modèle devrait être utilisé de préférence. Afin de tester les dysfonctions urinaires secondaires à l'hypertrophie prostatique, à la fin du traitement hormonal, les souris seront placées dans des cages métaboliques pendant 24 heures. Ces cages sont conçues de façon à laisser passer les urines en bloquant totalement les fèces. Cela nous permettra de tester l'effet des candidats médicaments sur les mictions pendant la phase active (la nuit) et la phase de repos (le jour). Ce système non-invasif de test de la fonction urinaire représente un gros avantage par rapport aux protocoles expérimentaux utilisés couramment. Notre protocole expérimental respecte donc le principe des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux (le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 13 animaux par groupe, et le nombre de groupes sera en fonction du nombre de molécules à tester), le remplacement (les tests in vitro n'étant pas probants, l'utilisation des souris est indispensable pour valider cette étude) et le raffinement car pour l'étude la fréquence mictionnelle, nous utiliserons un modèle non-invasif, qui réduit fortement la souffrance animale. Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. Les souris seront pesées 2 fois par semaine. La manipulation des souris et le gavage seront effectués exclusivement par du personnel ayant la formation nécessaire. Un

enrichissement du milieu dans les cages sera mis en place. Lors des expériences dans les cages métaboliques, afin de réduire le stress, les souris seront en contact visuel et olfactif entre elles. Ce projet nécessite l'utilisation de 52 souris.

**8856** Cette étude prévoit de réaliser une preuve de concept pour évaluer l'efficacité de l'injection d'un produit radioactif dans l'artère gastrique pour diminuer l'obésité chez le cochon.

L'utilisation thérapeutique de ce produit pour l'obésité devant être breveté, nous sommes dans l'obligation de confidentialité et garderons le nom de « produit d'intérêt ». Ce produit cible un peptide sécrété au fond de l'estomac que nous appellerons « peptide clé ».

La stratégie thérapeutique de cette preuve de concept repose sur l'administration intra-artérielle du produit d'intérêt dans l'artère gastrique, sous angiographie, pour la destruction ciblée de certaines cellules sécrétrices de ce peptide clé du fond de l'estomac.

L'utilisation de rayonnements ionisants (dépôt de 500 MbB) permet de réaliser cette approche spécifique et fiable, impossible autrement :

L'utilisation de l'angiographe permet quant à lui d'arriver aux 2 artères gastriques gauches qui alimentent le fond de l'estomac ou le produit d'intérêt sera déposé.

Afin de respecter la règle des trois R, les procédures expérimentales prévues dans le cadre de cette recherche ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum, selon les calculs d'effectifs effectués en s'appuyant sur des études précédentes, et des tests statistiques appropriés seront utilisés afin de mettre en évidence les résultats attendus. Cependant un maximum de 6 cochons seront à prévoir (4 au mieux si des variabilités interindividuelles n'empêchent pas de différencier les conditions entre les deux groupes prévus).

Dans un souci de raffinement, le long de l'expérience, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

L'examen d'imagerie (angiographie) dont bénéficient ces animaux est non invasif et les procédures menées dans ce projet se réalisent par du personnel formé et expérimenté sous anesthésie générale avec ventilation assistée et contrôle des paramètres physiologiques.

Le bien être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation d'une semaine avant les examens d'imagerie afin de s'habituer à leur nouvel hébergement et diminuer le stress. Ils seront hébergés dans des cages métaboliques conformes aux normes européennes et bénéficient d'un environnement climatisé à 21°C avec accès ad libitum à des croquettes et l'eau.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal.

**8857** Les troubles neuropsychiatriques (autisme, dépression) sont aujourd'hui les premières causes de souffrance et d'handicap à l'échelle mondiale. La résistance aux traitements pharmacologiques classiques a mené au développement d'alternatives thérapeutiques, plus prometteuses : les méthodes de neurostimulation. Le progrès considérable réalisé dans les domaines de la stimulation magnétique et électrique profonde souffre cependant de limitations techniques (précision ou chirurgie invasive). Il a été démontré récemment que la stimulation transcrânienne par ultrasons, c'est à dire l'application d'ondes mécaniques, permettait de moduler l'activité électrique cérébrale de façon non-invasive et géométriquement précise, outrepassant les limites des méthodes actuelles. L'altération de l'activité de certaines zones cérébrales étant caractéristique des troubles neuropsychiatriques, la stimulation ultrasonore pourrait prendre place dans l'arsenal thérapeutique des maladies neuropsychiatriques. Malgré cet intérêt et certaines études exploratoires, les paramètres ultrasonores requis pour une stimulation ultrasonore précise et efficace sont peu ou pas connus. Dans ce contexte, nous proposons de déterminer et d'optimiser les paramètres acoustiques requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace chez le rat et la souris mâle physiologique (non affecté par une maladie neuropsychiatrique). Le choix de ces deux espèces repose sur le fait que nous disposons



d'un modèle murin de dépression et d'un modèle rongeur d'autisme sur lesquels nous appliquerons, dans une deuxième phase, les paramètres acoustiques optimaux développés dans ce projet.

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

Remplacement : Dans une première approche expérimentale, nous avons mis en place et validé un dispositif expérimental permettant la stimulation ultrasonore. Dans la continuité de ce projet, nous souhaitons aujourd'hui optimiser les paramètres acoustiques requis pour réaliser une stimulation ultrasonore précise et efficace. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduction : Sur la base de nos études antérieures, notre étude nécessite 152 souris et 152 rats. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 8 animaux.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par groupe de 8 pour les souris et par 2 pour les rats en présence d'un objet d'enrichissement. Les animaux seront observés une fois par jour. Les procédures expérimentales sous anesthésie générale et les animaux sont manipulés sur un tapis chauffant avec une restriction minimum de l'isolement social. Les animaux sont placés sous surveillance à leur réveil.

**8858** L'obésité, actuellement considérée comme une épidémie, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. Cette pathologie, caractérisée par une surcharge pondérale, est également associée à une augmentation des lipides dans le sang (cholestérol et triglycérides) et dans le foie, mais aussi à des anomalies de la régulation de la glycémie. De plus, ces patients présentent des défauts de sécrétion de l'insuline et de sensibilité des organes périphériques à cette hormone.

Parallèlement, un nombre croissant de consommateurs est soucieux de maintenir un bon état de santé et améliore leur hygiène de vie en exerçant une activité physique régulière et en privilégiant une alimentation variée et équilibrée. Dans ce contexte, de plus en plus de compléments alimentaires voient le jour et dans cette étude nous analyserons l'effet de l'un d'entre eux connu pour son faible indice glycémique du fait de sa richesse en fibres.

Dans la bibliographie, il a été démontré que certains régimes riches en fibres (par exemple les fructo-oligo-saccharides) exercent des effets positifs sur l'organisme en induisant notamment un signal de satiété dépendants d'une induction de la production de glucose par l'intestin. Cependant, les effets de la fibre contenue dans ce complément alimentaire n'ont jamais été étudiés mais pourraient se révéler bénéfique dans une situation d'obésité, mais également dans une situation physiologique normale. De plus, le produit étant déjà commercialisé, aucun dommage n'est à prévoir pour l'animal. Ce projet est composé de deux étapes :

1/ Chez le rat, nous quantifierons la production intestinale de glucose à l'aide de traceurs métaboliques afin de déterminer son rôle dans les effets du complément alimentaire. Cette procédure a été mise au point au laboratoire chez le rat puisque non réalisable chez la souris du fait de la difficulté du geste chirurgical chez un animal de petite taille.

2/ Chez la souris nous étudierons les effets métaboliques induits par le complément alimentaire dans deux contextes métaboliques. Dans un premier protocole nous testerons l'effet de la supplémentation dans une situation pathologique telle que l'obésité induite par un régime riche en graisses et en sucres (High Fat High Sucrose, HFHS). Et dans un second protocole, nous analyserons si la supplémentation améliore l'équilibre énergétique dans un contexte physiologique qu'est le vieillissement. Dans ce protocole, nous réaliserons nos études sur des souris âgées de 6 mois qui commencent à développer de légers défauts métaboliques (résultats du laboratoire), comme chez l'homme au cours du vieillissement. Le but recherché est donc le maintien d'un métabolisme de santé en prévention des effets délétères du vieillissement.

Seront analysés dans les deux protocoles :

La prise de poids et la prise alimentaire

La composition corporelle (muscle, eau, gras...)

Les paramètres métaboliques (métabolisme du foie, glycémie, concentration sanguine de différentes hormones ...)

L'activation des zones cérébrales impliquées dans la régulation de l'équilibre énergétique

L'activation de la production de glucose par l'intestin

La composition de la flore intestinale

Le rôle de la production intestinale de glucose dans les effets métaboliques de la supplémentation sera évalué en comparant les résultats obtenus sur des souris contrôles ou dépourvues de production intestinale de glucose. Ces animaux ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles. Toutes les souris seront élevées et hébergées par groupe de 3 par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé.

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

Par souci de raffinement les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (hypoglycémie, prostration, ...). Le suivi du bien être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance. Des mesures seront prises afin d'éviter la douleur chez les animaux. En effet nous utiliserons des antalgiques tels que la buprénorphine, et des anesthésiques tels que l'isoflurane et la lidocaine pour une action locale. Lors de la réalisation de tests de tolérance à l'insuline ou au glucose, une crème anesthésiante sera également utilisée au niveau du site de prélèvement afin de limiter la douleur. De plus, les tests seront arrêtés en cas d'observation de tout comportement anormal ou d'hypoglycémie chez les animaux.

Le nombre total d'animaux, soit 36 rats et 192 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

**8859** Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous prévoyons maintenant d'utiliser des souris mimant la dystrophie myotonique de type 1 pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant.

Nous avons précédemment montré qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Nous avons développé une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable de diminuer le niveau de dynamine 2. Chez des souris malades injectées avec ce composé, nous avons obtenu leur rétablissement quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. Notre but est maintenant d'appliquer cette approche thérapeutique à d'autres maladies musculaires (dystrophies), plus particulièrement à la dystrophie myotonique de type 1.

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est la forme la plus commune de dystrophie musculaire chez les adultes, avec une incidence de 1 : 15000, se caractérisant notamment par une atteinte musculaire sévère et progressive, des défauts cardiaques et des déficits cognitifs. A ce jour, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Les souris sont requises pour ces expériences pour nous permettre de comprendre les propriétés physiologiques des différents muscles in vivo après modifications génétiques, de reproduire les pathologies humaines chez les souris et d'utiliser le petit animal pour comprendre la pathophysiologie des maladies musculaires. Les souris seront analysées in vivo/ in situ / in vitro et les tissus seront prélevés pour des expériences in vitro ultérieures (REPLACEMENT).

Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 4560 souris sera utilisé.

Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

**8860** Le projet sera réalisé chez la souris mais porte sur la dégénérescence valvulaire mitrale (DVM) du chien, pathologie cardiaque la plus fréquente dans cette espèce. Elle peut affecter toutes les races

canines mais les petites sont les plus concernées, comme le Cavalier King Charles, avec une incidence de 100% vers 11 ans en moyenne. Il est maintenant clairement établi que ces animaux ont une augmentation des concentrations sanguines de sérotonine provenant d'une dégranulation anormale des plaquettes et une surexpression de récepteurs sérotoninergiques du sous-type 5-HT<sub>2</sub>, au sein du tissu valvulaire mitral. Par ailleurs, dans un modèle murin de valvulopathie pharmacologique induit (par l'activation chronique du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> par la nordexfenfluramine, métabolite actif du benfluorex Médiator\*), a été démontré que le blocage des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> prévenait la mobilisation de cellules progénitrices endothéliales, à l'origine du remodelage valvulaire. Nous souhaitons désormais évaluer l'effet du blocage des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> dans un modèle murin de dégénérescence valvulaire spontanée, reproduisant les mécanismes physiopathologiques de la DVM canine. Une découverte fortuite de lésions valvulaires mitrales dans un modèle de souris FVB, fourni par Janvier (FVB/NRj), nous conduit à vouloir caractériser ces souris. De plus, après analyse des données biologiques fournies par les laboratoires d'élevage de souris, un certain nombre d'éléments nous laissent penser que la souche FVB, détenue par le laboratoire Jackson (FVB/NJ), pourrait présenter des lésions valvulaires plus importantes. Ces deux fonds dérivent d'un ancêtre commun lointain, mais leurs données biologiques actuelles sont différentes. Il ne s'agit pas d'un modèle transgénique et ces animaux n'ont jamais été validés et/ou publiés comme modèle de DVM. Dans le cadre du respect des bonnes pratiques de laboratoire relatives à l'expérimentation animale, la règle des 3R se décline pour le présent projet de la manière suivante : une surveillance quotidienne est réalisée par du personnel qualifié (les zootechniciens de la plateforme de l'animalerie, ainsi que la technicienne (détentriche d'un niveau 2)), nos animaux sont hébergés au sein d'une animalerie centrale conventionnée, dans des cages réglementaires de type II, regroupant 4 souris par cage (poids des animaux entre 22 et 30g), avec du milieu enrichi, de type tunnels en carton et des bâtons type « aspen bricks » à ronger. Concernant le remplacement, nous ne pouvons-nous affranchir de l'utilisation de modèle in vivo (les mécanismes de DVM étant trop complexes et intégrés), les souris constituent un bon modèle d'étude en raison de leur fréquence cardiaque élevée et donc un nombre de plicatures valvulaires par minute importants, accélérant les mécanismes de dégénérescence valvulaire. Concernant le raffinement, le stress lié à la prise de pression à la queue sera limité par une acclimatation des animaux à l'espace de contention, l'échocardiographie sera réalisée après anesthésie gazeuse à l'isoflurane et les prélèvements terminaux se feront après injection d'une dose létale de Doléthal. Enfin, nous réduirons le nombre d'animaux utilisés en incluant 10 animaux par temps et par fond génétique (en incluant 5 mâles et 5 femelles). En effet, il n'y a pas de raison de penser que l'atteinte valvulaire soit différente selon le sexe.

Dans un premier temps nous caractériserons l'atteinte valvulaire mitrale observée dans deux fonds génétiques de souris FVB (issues d'élevage différents) à différents âges, comparativement à un fond génétique C57Bl/6J (souris de même taille, même niveau d'activité, sans lésion valvulaire mitrale décrite), soit un total de 120 souris. Puis, dans un second temps, si ce modèle s'avère concluant, il pourra être utilisé pour des études pharmacologiques : 2 antagonistes sérotoninergiques +/- pimobendane (traitement de référence de l'insuffisance cardiaque, induite par la DVM chez le chien), incluant 60 souris.

**8861** Le glaucome est une maladie oculaire qui touche principalement les personnes âgées de plus de 45 ans. Il se définit par une montée de la pression intra-oculaire qui induit une forte douleur et la destruction progressive du nerf optique, entraînant une atteinte du champ visuel puis, plus tardivement de l'acuité visuelle et conduit à la cécité. Le milieu qui compose la chambre antérieure de l'œil fait l'objet d'une circulation, à volume constant. Le glaucome peut être dû à une surproduction par les corps ciliaires ou un défaut d'élimination au niveau du trabéculum. Parmi les causes de glaucome, on trouve l'accolement de l'iris devant le trabéculum (glaucome aigu), ou existence d'une membrane anormale et imperméable devant ce trabéculum dès la naissance (glaucome congénital). Nous développons une méthode de traitement qui consiste à détruire, par Ultrasons Focalisés à Haute Intensité, les corps ciliaires et ainsi limiter l'augmentation de volume et de pression liée à la production d'humeur aqueuse. Ce matériel a déjà fait l'objet d'études précliniques BPL sur lapin et d'études cliniques chez l'Homme. Le matériel testé durant cette étude est actuellement commercialisé sous marquage CE. Le produit est actuellement commercialisé et le taux de succès est de 70% de

personnes qui répondent au traitement. Afin d'augmenter d'avantage le nombre de répondeurs, il est nécessaire de comprendre exhaustivement les mécanismes d'action du traitement et de faire évoluer la sonde de thérapie. Chaque évolution du dispositif et de son utilisation doit être évaluée en préclinique aussi bien en terme de tolérance que d'efficacité. C'est pour cela que des essais complémentaires sur le lapin et porc doivent être réalisés afin de caractériser précisément le mode d'action du dispositif de traitement.

**Remplacement :** Ce protocole de validation de matériel nécessite d'utiliser un animal vivant et aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Le porc et le lapin ont été retenus car la structure de l'œil est similaire aux yeux humains. Même s'il est possible de cultiver des cellules cornéennes, l'évaluation du produit ne peut se faire sur un œil entier, d'un animal vivant, pour pouvoir suivre sur le long terme le résultat du traitement.

**Réduction :** Ces études vont nécessiter de travailler sur maximum 200 lapins et 100 porcs, nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Le nombre d'animaux qui sera utilisé sera le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement utilisables. S'il est possible d'obtenir des résultats, avec moins d'animaux, ce qui signifie que les réglages optimums sont trouvés plus vite, nous réduirons le nombre d'animaux.

**Raffinement :** Les animaux seront surveillés et observés tous les jours et pesés régulièrement. Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis : les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des porcs et des lapins, en limitant leur stress par un hébergement et un enrichissement adapté et en les manipulant par du personnel spécialement formé à cette espèce. Pour ces expériences, les animaux peuvent être hébergés en groupes sociaux harmonieux. Généralement, le traitement ne génère pas de douleur chez les patients humains chez qui la technique a déjà été utilisée. Si toutefois des signes cliniques apparaissaient, ils seraient rapidement traités au moyens de collyres et antalgiques adaptés à l'espèce animale.

**8862** Les morts par accidents cardiaques représentent une part importante des décès annuellement. La prédiction des accidents cardio-vasculaires reste un enjeu majeur en terme de santé publique, compte-tenu du nombre d'évènements concernés et de leur gravité. La caractérisation d'une lésion coronaire peut se faire par différentes techniques. Cependant, aucune des techniques actuelles ne permet d'évaluer la vulnérabilité de la plaque d'athérome en routine. Plusieurs études ont mis en évidence une relation étroite entre la rigidité aortique et la mortalité par infarctus du myocarde suggérant un lien étroit entre rigidité vasculaire et rupture de la plaque. Cette rigidité de l'artère peut être étudiée par un paramètre appelé la Vitesse de l'Onde de Pouls (VOP) qui se propage le long de l'artère. Notre équipe est déjà parvenue à mettre au point une méthode innovante de mesure de la VOP coronaire (VOPc). La VOPc pourrait donc apporter une information pronostique sur le potentiel d'instabilité d'une plaque d'athérome et le niveau de risque. Même si ces résultats sont prometteurs, la fiabilité et la prédictibilité de la mesure de la VOPc doit être testée. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de variations de paramètres physiologiques sur les valeurs de la VOPc chez un organisme vivant, en utilisant des appareillages qui seront par la suite utilisés chez l'Homme en clinique. Pour ce faire, l'utilisation d'animaux vivants dont le cœur a une taille et une anatomie comparable à l'Homme est indispensable. Notre choix s'est porté sur le modèle porcin. De plus, l'utilisation d'animaux vivants permet de faire varier les paramètres physiologiques pour obtenir nos résultats. Nos essais seront réalisés uniquement sous anesthésie générale, chez des animaux qui ne seront pas réveillés à la fin des expériences. Ils seront maintenus en permanence inconscients et avec une couverture analgésique adaptée. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera au maximum de 30 par an sur 5 ans. Ce nombre est déterminé par le nombre de paramètres que nous devons faire varier pour tester la fiabilité de la mesure de VOP et ainsi nous assurer qu'elle permet de prévoir l'apparition d'un accident cardiaque. Sur cet effectif, seuls les animaux nécessaires seront utilisés. Si nous obtenons les résultats qui permettent d'appliquer cette mesure à l'Homme, le projet sera arrêté. Le nombre prévu est le nombre minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables.

Avant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe sociaux harmonieux et soignés par du personnel qui a été formé à la reconnaissance des signes d'inconfort chez le porc.

**8863** Du fait du fort nombre de cas de cancers et d'une mortalité associée encore élevée, l'oncologie représente un enjeu scientifique et clinique très important. Dans le but d'identifier de nouveaux candidats médicaments, les chercheurs développent de nouveaux outils in vitro permettant de sélectionner et d'optimiser des composés. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de glioblastome chez la souris. Incurable, le glioblastome est le cancer du cerveau le plus courant, sur lequel la recherche bute depuis des années. Son incidence progresse chaque année avec le vieillissement général de la population.

Le modèle murin de glioblastome ne peut être remplacé par de l'expérimentation in vitro. En effet, l'intérêt est d'obtenir un modèle intégré complexe mimant au plus près la pathologie humaine. C'est le cas, les caractéristiques des tumeurs chez la souris sont similaires à ce que l'on retrouve chez l'humain (hypoxie de la tumeur, infiltrat tumoral, réactivité de la glie.)

Le modèle que nous proposons permettra d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Dans cette optique, nous proposons le modèle dans une activité de recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques, avec un nombre de 15 études par an, comprenant 50 souris par étude (correspondant à 750 souris par an soit 3750 animaux en totalité).

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant les règles de bioéthique (utilisation d'analgésiques pour réduire la souffrance, recours à l'anesthésie) et conformément à la législation en vigueur. Le nombre d'animaux est de 10 par groupe pour obtenir des résultats statistiquement robustes. Afin de restreindre le nombre d'animaux, nous avons investi dans du matériel de haute technicité (cadre stéréotaxique de qualité) qui nous permet de manipuler les animaux dans les meilleures conditions de chirurgie et qui nous permettent d'obtenir une grande reproductibilité dans le modèle et ainsi de limiter le nombre d'animaux implantés.

Les composés testés en traitement sur les animaux auront été préalablement testés in vitro par le client, pour déterminer les doses à utiliser et s'affranchir de la toxicité des composés. Les animaux participant à ces études seront traités selon différentes méthodes, propre à chaque client, comme des traitements par injection (intraveineuse, intrapéritonéale, intracérébrale) ou per os (gavage oral). Ils sont suivis pour leur poids, leur état général, la croissance tumorale (imagerie). Certains groupes subissent du stress de contention afin de mimer l'état de stress du patient.

Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien être (fratrie), sur de la litière en copeaux de peupliers et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

**8864** Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs mammaires chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Nous développons de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie ayant pour but de restaurer l'activité du système immunitaire et permettant ainsi un arrêt de la progression tumorale / l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'anticorps innovants ciblant une molécule impliquée dans l'échappement immunitaire tumoral. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de service, recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques, avec un nombre de 20 études par an, comprenant 100 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 10000 souris).

Nous proposons donc d'évaluer dans notre activité de service, les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins syngéniques bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris immunocompétentes de même fonds génétiques. Dans le cas particulier d'étude sur des lignées de cellules tumorales humaines, nous proposons aussi des modèles sur des souris immunodéficientes.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, Raffiner, Remplacer) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés utilisés auront été préalablement testés in vitro par le client, afin de déterminer les doses

requis, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Afin de remplacer les animaux si des tests complémentaires sont nécessaires ils seront effectués in vitro. Dans le cas précis, les modèles de cancers sont des modèles intégrés qui nécessitent l'utilisation de l'expérimentation sur l'animal afin d'être au plus proche de la physiopathologie. Les groupes sont de 20 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien être (en fratrie) et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

**8865** Le surpoids est une affection touchant une part importante de la population des chats domestiques, qui peut être à l'origine de nombreux problèmes de santé. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de différents régimes alimentaires sur la perte de poids chez le chat. Deux types de régime et deux types d'aliment seront mis en place au cours de cette étude en vue de réduire significativement le poids d'animaux en surpoids afin qu'ils retrouvent un poids de forme. L'objectif de l'étude étant de démontrer qu'un régime adapté permet de réduire significativement le poids d'individus en surpoids tout en limitant l'impact sur le comportement alimentaire. Pendant cette étude, différents paramètres seront évalués pour vérifier l'efficacité du protocole sur la perte de poids, ainsi que sur le comportement alimentaire. La mise en place des 3R pour cette étude a consisté en 1) le calcul de l'effectif requis pour chaque groupe par méthode statistique tenant compte des variabilités observés sur les paramètres mesurés au sein de la population, ainsi 54 chats seront au total utilisés pour l'étude, 2) l'utilisation de méthode non invasive (ostéodensitométrie) pour le calcul de la composition corporelle, le contrôle général de l'état de santé des animaux avant anesthésie générale, l'utilisation d'un analgésique en phase de prémédication de l'anesthésie, et l'utilisation de tapis chauffant et la mise en place d'une perfusion après anesthésie pour favoriser une récupération plus rapide des animaux, 3) il n'existe pas aujourd'hui de modèles in-vitro ou d'autres méthodes alternatives qui permettraient d'étudier l'évolution du poids et du comportement lors de régime de restriction alimentaire chez le chat. Il est de ce fait nécessaire de réaliser l'étude in-vivo. Pour finir, il y a la possibilité de réutiliser les animaux après l'étude considérant que les procédures expérimentales utilisées sont de classe légère. Ce projet contribue au développement d'aliments destinés à améliorer le maintien d'un poids de forme chez le chat.

**8866** Les dysfonctionnements du système nerveux central affectent un nombre croissant de personnes, notamment en raison du vieillissement de la population et de l'allongement de l'espérance de vie. Ceux-ci peuvent être traumatiques (e.g., accidents, lésions vasculaires), psychiques (e.g., autisme, dépression, anorexie, troubles bipolaires), neurodégénératifs (e.g., Parkinson, Alzheimer, Huntington), ou liés à des tumeurs (e.g., glioblastomes, médulloblastomes, neurinomes). De fait, il y a un enjeu majeur à développer des nouveaux traitements mais aussi à comprendre le fonctionnement de la structure biologique extrêmement complexe qu'est le cerveau.

Le développement de thérapies et d'examen réside entre autre dans des approches neurotechnologiques telles que les neuroprothèses (déjà utilisées en clinique avec la stimulation cérébrale profonde, les implants cochléaires, et actuellement les débuts des implants rétiniens) ou les interfaces cerveau-machine. Avec pour objectif d'améliorer les performances de ces systèmes, ce projet vise à développer des implants corticaux permettant de stimuler et d'enregistrer de manière stable l'activité neuronale du cortex. Le test de ces implants corticaux in vivo chez le rat permettra d'améliorer les performances des neuroprothèses et le processus d'apprentissage à l'utilisation des dispositifs médicaux interfaces cerveau-ordinateur.

Pour limiter autant que faire se peut nos investigations sur les animaux, ces implants seront dans un premier temps testés in vitro. Leur cytotoxicité sera évaluée avec la lignée cellulaire de fibroblastes L929 (ISO 10993-5). Néanmoins, certaines études ne peuvent pas être modélisées et nécessitent le recours à un modèle rongeur. Des tests in vivo chez le rat adulte seront ainsi nécessaires pour évaluer la biocompatibilité des implants ainsi que leur capacité à enregistrer et stimuler les mêmes neurones au cours du temps.

Dans un souci de protection animale, les tests seront strictement limités aux effectifs nécessaires pour permettre une interprétation statistique de nos résultats expérimentaux. Nous utiliserons pour cela 360 rats sur 5 ans. Sept types de dispositifs d'électrodes seront implantés sur deux périodes différentes afin de déterminer leur biocompatibilité, ce qui nécessitera un minimum de 2 groupes de 20 animaux pour valider la biocompatibilité d'un type de dispositif. Leur fonctionnalité pour l'enregistrement et la stimulation neuronale sera également évaluée, ce qui devra être répété a minima sur 60 animaux explorés en condition anesthésiée, et 60 animaux en situation comportementale éveillée. Pour veiller au bien-être des animaux au cours de notre projet expérimental, la santé des animaux sera surveillée quotidiennement tout au long des expérimentations, dont les protocoles seront validés par un vétérinaire. Ce suivi visera à détecter d'éventuels états de souffrances pour mettre en place une gestion médicalisée de la douleur si nécessaire.

**8867** Le but de cette étude est d'évaluer l'effet métabolique, immunologique, et clinique d'un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur 1 des Fibroblast Growth Factor sur un modèle murin de la Sclérose Latérale Amyotrophique, une maladie neurodégénérative des nerfs moteurs.

Pour cela, nous projetons d'acquérir des souris génétiquement modifiées porteuses du gène codant une forme mutée de l'enzyme humaine Superoxyde dismutase. Les souris mâles seront réparties aléatoirement en 2 groupes, un groupe traité de 12 souris transgéniques, un groupe contrôle de 12 souris transgéniques.

L'ensemble des expérimentations sera réalisé en double sur des souris mâles non-transgéniques, également réparties en un groupe traité et un groupe contrôle.

Soit un total de 48 souris.

Plusieurs éléments sont mis en œuvre afin de suivre au mieux la règle des 3R :

- Remplacement : les modèles in vitro que nous utilisons par ailleurs pour d'autres projets sont inopérants dans une telle étude qui utilise des anticorps dans un but thérapeutique passant par une amélioration comportementale.

- Réduction : le nombre de groupes a été optimisé et le nombre d'animaux par groupe a été réduit à son maximum.

- Raffinement : l'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Sizzle Nest). Les animaux seront surveillés chaque jour pendant toutes les semaines de l'étude. Elles seront surveillées toutes les 30 min pendant 2h après injection du R1Mab et des critères de point d'arrêt anticipé codifié.

**8868** La toxoplasmose est une maladie parasitaire causée par le parasite *Toxoplasma gondii*. Le parasite est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud, dont l'Homme. La contamination naturelle a lieu lors de l'ingestion de viande contaminée par exemple. L'infection va alors se dérouler en deux phases. La phase aiguë de l'infection est caractérisée par la dissémination parasitaire, puis sous la pression du système immunitaire, le parasite va s'enkyster dans les muscles et le cerveau.

La forme la plus infectieuse est le kyste parasitaire.

Afin d'étudier l'infection toxoplasmique, il est donc nécessaire de produire et de maintenir le cycle kystique des souches parasitaires in vivo.

Ce projet est donc consacré au maintien in vivo de 3 souches parasitaires utilisées de façon mutualisée pour différents projets de recherche. Nous respecterons la règle des 3R. Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé. Tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. Au cours de ce projet, 309 souris seront manipulées sur une période de 5 ans. Nous avons prévu des groupes avec un nombre minimum d'animaux. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et observés régulièrement au cours des expériences afin de surveiller les points limites (perte de poids, changement de comportement, apparence physique). La fréquence de surveillance des animaux sera adaptée à une cinétique infectieuse maîtrisée, impliquant si nécessaire l'arrêt des expérimentations. Les injections et les prélèvements sanguins sont réalisés sous brève anesthésie générale. La méthode d'euthanasie des animaux est réglementaire et réalisée sous anesthésie générale.

Aucun modèle in vitro ne permet de produire des kystes parasitaires.

**8869** Le choc septique (défaillance multi-viscérale survenant au cours d'une infection grave associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS) est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population et dont la mortalité est comprise entre 30 et 50%. Malheureusement il n'existe pas de traitement adapté au choc septique ou au SIRS, conduisant à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le SIRS caractérise par une libération, une expression anormalement élevée d'une multitude de composées de l'inflammation. La manifestation du SIRS chez l'adulte inclut au moins 2 des critères suivants : une altération de la respiration, une dérégulation de la température, une tachycardie et un état hyper ou hypo-inflammatoire. De façon générale, un patient est considéré en état de SIRS lorsqu'il présente deux critères ou plus.

Un traitement a été mis au point visant les réponses aux stress tels qu'on peut les retrouver dans les pathologies associées à une inflammation (l'ischémie-reperfusion, les états de chocs, comme le choc septique). L'avancée de leurs travaux et du développement des molécules nécessite, avant l'arrivée en clinique, la validation sur les modèles animaux pertinents des pathologies ciblées, le SIRS dans nos travaux. Notre projet vise à évaluer, grâce à nos modèles animaux, le potentiel thérapeutique des molécules A et B proposées sur la réponse au stress au cours de la pathologie. Le but final de ces études est de valider un traitement dans ce modèle animal permettant de passer en phase d'essai clinique chez les patients en choc septique.

Le modèle animal de choc septique le plus adapté est ici le modèle par injection de Lipopolysaccharide (LPS) chez le rat. Cela permet de générer un choc endotoxémique avec la symptomatologie du choc septique (SIRS, hypotension, défaillance métabolique et dysfonction multi-viscérale) de manière simple, très reproductible et, dans une cinétique bien connue et maîtrisée dans notre laboratoire. La gravité du choc est facilement maîtrisable par des variations du mode d'injection et de la quantité de LPS injectée et ne nécessite que peu de mise au point. La simplicité de la mise en place et la reproductibilité de ce modèle permettent un criblage des molécules efficaces avant d'aborder un modèle plus complexe nécessitant une chirurgie.

Les expérimentations sont conçues afin de respecter la règle des 3R : Réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum tout en ayant des données statistiques assez puissantes (dans la mesure du possible les tests seront faits en aveugle, afin d'augmenter la puissance de l'étude) qui ne nécessiteront pas l'utilisation de nouveaux animaux et l'utilisation des animaux ne sera faite uniquement car le modèle n'est pas Remplaçable. Les différentes procédures expérimentales de la première étape (mise au point) seront réalisées sur des effectifs réduits afin de déterminer les temps optimaux d'administration du traitement. Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales auront été déterminées, les procédures seront réalisées sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans la première étape.

Afin de raffiner le modèle des mesures sont mises en places afin de maximiser le confort des animaux par exemple avec la mise en place de scores et de points limites comprenant des critères morphologiques (aspect, comportements) et physiologiques (température, paramètres hématologiques comme les lactates), l'administration d'antidouleur en début de procédure est prévue et la réinjection d'une dose supplémentaire peut être considérée en cas de signe de douleur. Enfin plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=5-15 suivant les manipulations). Au total, le projet devrait intégrer 273 animaux au maximum, répartis entre les différents groupes nécessaires à l'étude : 20 pour la mise au point d'un traitement analgésique, 60 pour la mise au point des conditions optimums pour la suite de l'étude, permettant de réduire le nombre d'animaux et d'augmenter la puissance statistique. 80 rats au maximum sur les tests de nos traitements in vivo et l'établissement d'une bio collection pour les études biochimiques. Enfin 113 animaux maximum seront utilisés pour l'étude de mortalité répartis entre les contrôles et les rats traités à 3 temps différents.

**8870** Dans le cerveau, des cellules spécialisées, les astrocytes, favorisent le bon fonctionnement des neurones. Les astrocytes ont aussi la propriété de réagir aux lésions du système nerveux central en changeant leur structure et leur fonctionnement. Ce phénomène largement décrit mais encore mal



compris est appelé la réactivité astrocytaire. Il survient dans la grande majorité des nombreuses maladies qui touchent le cerveau (il y a plus de 600 maladies neurologiques connues).

Des données récentes montrent que les astrocytes réactifs sont différents en fonction des conditions pathologiques et suggèrent qu'ils pourraient avoir des effets variables, bénéfiques ou délétères.

Les objectifs de ce projet sont de :

1/ comparer les changements moléculaires et fonctionnels des astrocytes réactifs induits dans 3 situations pathologiques différentes : démyélinisation, neuroinflammation et sur-activation neuronale, qui se produisent respectivement dans la sclérose en plaques, dans les maladies neurodégénératives et dans l'épilepsie.

2/ déterminer la contribution des astrocytes réactifs aux déficits spécifiques induits dans chacun de ces modèles. Pour cela, nous bloquerons spécifiquement l'apparition des astrocytes réactifs par des vecteurs viraux qui infectent les astrocytes et codent pour un inhibiteur de la réactivité astrocytaire.

Les maladies neurologiques conduisent à des altérations multiples du fonctionnement cérébral. Ni la modélisation informatique ni l'expérimentation sur cellules in vitro ne permettent aujourd'hui d'appréhender ces processus très complexes. De plus, notre projet s'intéresse aux interactions entre les neurones et les astrocytes et seule l'étude du cerveau entier in situ permet de conserver la complexité de ces interactions. Le fonctionnement du cerveau des souris est suffisamment proche de celui de l'homme pour étudier de façon pertinente les changements moléculaires et cellulaires se produisant dans les astrocytes au cours de la réactivité. Notamment, des organismes plus simples tels que C Elegans, la drosophile ou le poisson zèbre présentent des cellules gliales qui ressemblent à des astrocytes mais dont l'organisation et le comportement diffèrent de ceux des mammifères.

L'utilisation de souris transgéniques dont les astrocytes sont fluorescents, nous permet d'isoler et d'analyser les astrocytes du cerveau de souris

Le projet prévoit au maximum 260 rongeurs nés et élevés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales (injection stéréotaxiques dans le cerveau sous anesthésie et analgésie, et euthanasie pour prélèvement et étude du cerveau) ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation, pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

**8871** Cette séance de travaux pratiques (TP) chez la souris est destinée à des étudiants dont la formation peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux, afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes publics ou privés de recherche.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Les objectifs pédagogiques de ces travaux pratiques sont les suivants :

- Mettre en pratique l'enseignement théorique à la fois d'un point de vue pharmacologique concernant les effets des médicaments antidépresseurs et d'un point de vue éthique vis-à-vis de l'utilisation de l'animal en expérimentation.

- Savoir mettre en application un protocole expérimental de pharmacologie comme demandé dans le programme pédagogique et réaliser un tableau de recueil de données approprié au déroulement de ce protocole pour garantir la traçabilité des données brutes expérimentales.

- Utiliser un test de comportement chez l'animal prédictif d'une activité antidépressive de molécules afin d'observer la différence de comportement des animaux traités par un antidépresseur (la désipramine) comparativement aux animaux contrôles et quantifier les effets de la substance étudiée. Sensibiliser les étudiants à la variabilité des mesures dépendante de l'expérimentateur et des paramètres extérieurs lors d'un test comportemental.

- Consolider la manipulation de la souris vigile (contention, administration par voie intrapéritonéale) avant l'apprentissage de la technique d'administration par voie orale réalisée dans le TP suivant concernant l'effet de substances sur le système nerveux parasymphatique.

# Réduction : Chaque promotion, de 50 étudiants au maximum, est divisée en 2 groupes de 25 étudiants. Par conséquent, ce TP aura lieu sur 2 séances (1 séance par groupe d'étudiants, encadrés par 2 enseignants). Les étudiants seront répartis par binôme et deux lots de deux animaux seront constitués par binôme (1 lot contrôle et 1 lot expérimental). Ainsi lors d'une séance, 2 souris par étudiant seront utilisées. Chaque étudiant prendra en charge le traitement et le suivi d'un animal par lot pour évaluer les effets de l'antidépresseur comparativement aux animaux contrôles.

Afin de réduire le nombre d'animaux, les souris incluses dans ce TP auront déjà été utilisées la semaine précédente dans un 1er protocole concernant la narcose induite par un mélange d'anesthésiques. Cette réutilisation des animaux avec une procédure de degré de sévérité équivalent au précédent TP a été validée par le vétérinaire référent et sera réalisée selon ses recommandations. De même les souris supplémentaires du 1er protocole (maximum 5 souris) ainsi que les 4 souris affectées à la démonstration des gestes techniques par les enseignants pourront être réutilisées au cours du présent TP en cas de problème particulier (exemple : souris dont l'état de santé ne permettrait pas son intégration à ce nouveau protocole expérimental).

Ainsi aucune commande de souris ne sera réalisée pour ce TP, tous les animaux (109 par an pour 50 étudiants soit 545 pour 5 ans) seront issus du 1er TP concernant l'étude de la narcose.

De plus, pour l'analyse des résultats, les valeurs obtenues pour l'ensemble des binômes au cours d'une séance seront regroupées permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux par lot et par binôme.

# Raffinement : les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux de 12 animaux maximum, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (papier absorbant et une petite maison soit en polycarbonate soit en carton). Ces animaux ayant été utilisés dans un précédent protocole sur l'étude de la narcose, une semaine de récupération sera laissée aux animaux avant de les introduire dans le présent TP. Cette réutilisation validée par le vétérinaire référent se fera selon ses recommandations.

# Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le Programme Pédagogique National prévoit, en pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part d'illustrer les effets des médicaments antidépresseurs et d'évaluer in vivo les effets de la molécule étudiée et d'autre part de renforcer l'apprentissage par nos étudiants de la manipulation de la souris vigile (contention, administration par voie intrapéritonéale) avant d'aborder la technique d'administration par voie orale dans le TP suivant.

Par ailleurs le programme pédagogique précise pour nos étudiants que l'un des prolongements possibles à cette formation en pharmacologie in vivo est l'habilitation à participer à des expérimentations animales de niveau praticien (formation réglementaire que nous proposons aux étudiants intéressés).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan pharmacologique (observation et quantification des effets de la substance étudiée) que sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration de substances chez l'animal vigile...)

**8872** Les tests décrits dans ce projet concernent le développement pré-clinique de modèles pharmaceutiques permettant d'évaluer les effets pharmacologiques principaux de produits pharmaceutiques, par rapport aux cibles thérapeutiques visées. Ils permettent également d'établir le profil de sécurité de nouvelles substances médicamenteuses avant leur utilisation chez l'homme, et ce dans le cadre des recommandations européennes, américaines ou japonaises en vue de l'obtention des autorisations de mise sur le marché. Les tests utilisés dans ce cas sont des modèles prédictifs en abus et dépendance.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que

les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique et leur sécurité, et tout particulièrement l'évaluation du risque à induire une addiction (test de discrimination, d'auto-administration ou de préférence de drogue) ou des symptômes de sevrage (précipité par un traitement ou non, tests de rechute). Ces tests pouvant potentiellement générer du stress chez l'animal, nous mettons tout en œuvre pour le réduire (manipulation fréquente des animaux, mise en place d'enrichissement dans leur hébergement.). Les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs vont consister en un suivi de points limites (incluant une surveillance de l'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, l'appétit, le poids, l'état d'hydratation, les tremblements ou convulsions), permettant d'euthanasier tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Aussi, le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, les animaux sont réutilisés dans d'autres études afin de réduire au maximum le nombre total d'animaux impliqués. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés lors des années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 15000.

**8873** Le but de ce projet d'une durée de 3 ans est d'étudier les effets de 18 ingrédients d'origine végétale administrés dans le régime alimentaire sur l'anxiété et la dépression chez le rat mâle Wistar Han. 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 plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations dues aux effets secondaires importants et/ou à 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.

La dépression est un trouble psychiatrique se caractérisant notamment par un sentiment de désespoir et de monotonie, une perte de motivation et de facultés de décision, une anhédonie, des troubles alimentaires et du sommeil, des pensées morbides et une perte de l'estime de soi.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la dépression concerne 300 millions de personnes dans le monde et 800 000 personnes meurent en se suicidant chaque année. D'ici 2020, la dépression deviendra la deuxième cause d'invalidité à travers le monde, après les troubles cardiovasculaires.

Dix-huit ingrédients d'origine végétale (1 à 18) dont l'innocuité a été prouvée dans des études de Toxicologie effectuées au préalable chez l'animal, sont des candidats potentiels pour être efficaces sur l'anxiété et la dépression selon des essais préliminaires effectués in vitro. Pour réaliser ce screening, 6 études seront réalisées, nécessitant chacune 60 rats mâles Wistar Han d'un poids de 175-200 g (n=12 par groupe de traitement) soit 360 rats pour le projet et qui seront répartis comme suit pour chaque étude réalisée :

- Groupe 1 : Régime contrôle, référence pour l'anxiété puis véhicule pour la dépression,
- Groupe 2 : Régime contrôle, véhicule pour l'anxiété puis référence pour la dépression,
- Groupe 3 : Régime 1 contenant l'ingrédient d'origine végétale 1 à tester et véhicule,
- Groupe 4 : Régime 2 contenant l'ingrédient d'origine végétale 2 à tester et véhicule,
- Groupe 5 : Régime 3 contenant l'ingrédient d'origine végétale 3 à tester et véhicule.

Les quantités d'ingrédients varieront en fonction de leur nature et de leur spécificité mais l'équilibre du régime alimentaire sera toujours respecté.

Ces animaux seront placés à 3 par cage (cages ouvertes de 1300 cm<sup>2</sup> de surface, 18 cm de hauteur) dans une animalerie climatisée, à une température de 22 ± 2°C et une humidité relative de 50 ± 20%, et ils seront soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00)

pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques d'Aspen, seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien être (Raffinement). Ils auront accès à leur régime respectif et à l'eau fournis ad libitum.

L'expérimentation débutera après une période d'acclimatation d'une semaine des animaux aux conditions du laboratoire.

Les animaux seront pesés 3 jours avant le début des traitements afin de les répartir de façon homogène dans les 5 groupes de traitement selon leur poids. Ils recevront les régimes contenant les ingrédients d'origine végétale pendant 3 semaines avant la réalisation d'un Open Field (OF) et d'un Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) et pendant une semaine supplémentaire avant la réalisation du test de désespoir comportemental (TDC). Les prises alimentaire et hydrique ainsi que le poids des animaux seront relevés deux fois par semaine. Ils seront pesés de nouveau avant chaque test effectué.

Les traitements seront administrés dans le régime en respectant l'équilibre alimentaire de ce dernier (Procédure 1). Les tests comportementaux seront effectués après 21 ou 28 jours, après traitement oral (Procédure 2) : Open Field (Procédure 3) de 5 minutes puis LCS (Procédure 4) pendant 5 minutes également, TDC (Procédure 5) à J27 et J28. Les animaux seront euthanasiés à l'issue de ces tests.

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, et si des modifications de leur comportement sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ou s'ils perdent trop de poids (plus de 20% par rapport à leur poids maximum atteint au cours de l'étude), ils seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro pour évaluer les effets anti-stress et antidépresseur de substances (Remplacement), mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs (Réduction). Dans ce but, les traitements des groupes contrôles et références seront croisés afin d'économiser un groupe d'animaux par étude soit au total 72 rats pour la totalité du projet (soit une réduction de 17% d'animaux au total pour les 6 études), nécessitant pour cela une période de lavage (ou "washout") entre les tests du LCS et du TDC.

**8874** L'objectif de notre projet est d'évaluer les effets d'un produit d'origine naturelle, administrés par voie orale à 2 doses, sur la dépression chez le rat mâle Wistar Han.

La dépression est un trouble psychiatrique se caractérisant notamment par un sentiment de désespoir et de monotonie, une perte de motivation et de facultés de décision, une anhédonie, des troubles alimentaires et du sommeil, des pensées morbides et une perte de l'estime de soi.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la dépression concerne 300 millions de personnes dans le monde et 800 000 personnes meurent en se suicidant chaque année. D'ici 2020, la dépression deviendra la deuxième cause d'invalidité à travers le monde, après les troubles cardiovasculaires.

Le produit X à évaluer, dont les études de toxicité ont montré son innocuité, a été retenu pour être tout d'abord testé chez l'animal.

Pour réaliser ce projet, 48 rats mâles Wistar Han d'un poids de 200-225 g seront nécessaires. Ils seront répartis à 12 par groupe expérimental comme suit :

- Groupe 1 : traitement avec le véhicule = eau de source,
- Groupe 2 : traitement avec un composé de référence = imipramine, à la dose de 10 mg/kg/j,
- Groupe 3 : traitement avec le produit X à la dose de 0,15 mg/kg/j,
- Groupe 4 : traitement avec le produit X à la dose de 0,30 mg/kg/j.

Ces animaux seront placés à 2 par cage (cages ouvertes de 1300 cm<sup>2</sup> de surface, 18 cm de hauteur) dans une animalerie climatisée, à une température de 22 ± 2°C et une humidité relative de 50 ± 20%, et ils seront soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00) pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des feuilles de papier absorbant seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien être (Raffinement). Ils auront accès à un régime standard et de l'eau fournis ad libitum.

L'expérimentation débutera après une période d'acclimatation d'une semaine des animaux aux conditions du laboratoire.

Les animaux seront pesés 3 jours avant le début des traitements afin de les répartir de façon homogène (de les randomiser) dans les 4 groupes de traitement suivant leur poids. Ils seront pesés de nouveau le premier jour de traitement puis 2 fois par semaine pendant toute la durée des expérimentations afin d'ajuster le volume de traitement à leur poids.

Les traitements seront administrés quotidiennement par gavage pendant 22 jours (Procédure 1).

Des tests comportementaux seront effectués au cours des 3 derniers jours de l'expérimentation : Un test d'Open-Field effectué à J20 (Procédure 2) pour évaluer l'activité locomotrice des animaux, et un test de nage forcée (dit de Porsolt) à J21 et J22 (Procédure 3) permettant d'évaluer le comportement de type dépressif des animaux.

A l'issue de ces tests comportementaux, les animaux seront euthanasiés et leur cerveau sera prélevé pour effectuer des analyses histologiques et des dosages biologiques.

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, et si des modifications de leur comportement sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ou s'ils perdent trop de poids (plus de 15% en 3 jours ou plus de 20% par rapport à leur poids maximum atteint dans l'étude, chaque animal étant son propre témoin), ils seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs (Réduction).

**8875** En dépit d'intenses efforts pour traiter le cancer du poumon, les taux de survie demeurent décourageants. L'incapacité des thérapies actuelles à lutter contre une maladie aussi agressive rend urgent le besoin de développer de nouvelles stratégies de traitement.

Une méthode de radiothérapie fractionnée spatialement (SFR) a démontré son efficacité pour l'interruption du système vasculaire de la tumeur. Notre laboratoire a testé ce traitement sur des modèles de souris pour le cancer de la peau. Les résultats ont prouvé la supériorité de la SRF comparée aux méthodes de radiothérapie conventionnelle (RC). En outre, nos résultats préliminaires se sont avérés encourageants avec de faible taux de fibrose pulmonaire chez les rats après le traitement SFR. Cette méthode constitue donc une alternative prometteuse à la radiothérapie conventionnelle, qui a tendance à provoquer l'apparition d'une fibrose pulmonaire prononcée.

Pendant ce projet, qui nécessitera 1330 souris, nous souhaiterions tester les propriétés de la SRF lui permettant de combattre le cancer du poumon, et si les résultats sont positifs, étudier le mécanisme cellulaire et moléculaire responsable de l'efficacité du traitement.

Notre projet a été évalué afin qu'il soit en conformité avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement :

- Remplacement : nous ne pouvons pas remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou une simulation informatique car ce projet mesure à la fois les taux de survie et de fibrose pulmonaire chez les animaux après le traitement anti-tumoral.

- Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été déterminé par des méthodes statistiques, ce qui nous a permis de réduire autant que possible le nombre de souris utilisées. Le suivi de la croissance de la tumeur sera réalisé in vivo, ce qui permettra une réduction drastique du nombre d'animaux impliqués dans les expérimentations.

- Raffinement : Les procédures susceptibles de causer du stress aux animaux seront effectuées sous anesthésie générale et la température corporelle des animaux sera régulé avec des tapis chauffants et des cages de réveil à température régulée. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement pendant toute l'expérimentation. Une échelle de notation de la souffrance basée sur les signes de gêne ou de douleur sera utilisée pour évaluer l'état de chaque animal. Ceci nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de souffrance.

Nous pensons que ces travaux constitueront une étape pré-clinique essentielle, qui permettra d'appliquer la SFR pour le cancer du poumon à d'autres tumeurs malignes et à la clinique.

**8876** Dans la sphère cranio-faciale, les causes de pertes de substances osseuses peuvent être d'origine malformatives, traumatiques ou secondaires aux exérèses tumorales. Plusieurs procédés permettent de les restituer selon la taille du déficit : les greffes osseuses, les biomatériaux phosphocalciques ou encore les transplants micro-anastomosés. Les greffons autologues et les substituts osseux peuvent être utilisés de manière isolée ou combinée dans les terrains les plus favorables (défaut osseux limité, richesse médullaire environnante, éloignement des zones contaminées). Dans les défauts osseux maxillo-mandibulaires étendus, souvent situés en zone contaminée ou cicatricielle, seuls les transplants osseux microanastomosés sont indiqués, au prix de procédés chirurgicaux lourds et d'une morbidité accrue. L'étude chez l'animal a montré que l'association de biomatériaux phosphocalciques de type « Biphase Calcium Phosphate » (BCP) ou d'un autre biomatériau phosphocalcique (CaP) à de la moelle osseuse totale (MOT) permettait d'obtenir une néoformation osseuse mais sans pouvoir égaler les techniques de greffe osseuse autologue. Nos travaux précédents, ont d'ailleurs montré l'intérêt d'associer une autogreffe de moelle osseuse totale (MOT) ou des cellules souches mésenchymateuses différenciées (SCM) à des BCP pour favoriser la repousse osseuse dans ce territoire à faible trophicité. Les résultats obtenus par ces associations étaient proches bien qu'inférieurs à ceux obtenus par la technique de référence (greffe autologue) responsable de morbidités et permettant la reconstruction de volumes limités. La réparation osseuse peut être compromise du fait de l'altération de l'environnement de la zone à régénérer (hypoplasie tissulaire, cicatrices), et/ou du fait du volume du greffon, qui n'est que lentement revascularisé et de manière centripète. L'utilisation de facteurs moléculaires (adjuvants) améliorant la régénération osseuse en terrain défavorable est une voie de recherche prometteuse pour pouvoir limiter le prélèvement osseux autologues ou l'utilisation de procédés chirurgicaux lourds pour les patients. L'association d'adjuvants aux biomatériaux peut ainsi avoir un rôle majeur dans l'amélioration des procédés d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) en vue de se substituer aux prélèvements autologues chez le patient. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux phosphocalciques permettant une meilleure revascularisation et l'apport des adjuvants dans la régénération osseuse *in vivo* dans des modèles pré-cliniques de défauts de calvaria (voûte crânienne) chez le rat Lewis. Les adjuvants étudiés en ITO pour l'amélioration de la néoformation osseuse seront des transporteurs en dioxygène (TO<sub>2</sub>), en vue d'améliorer la diffusion de l'O<sub>2</sub> au sein des biomatériaux, la MOT comme apport de cellules souches, le patch riche en fibrine (PRF) permettant l'apport de facteurs de croissance cellulaire. Les 2 nouvelles classes de biomatériaux phosphocalciques (CaP) seront : l'hydroxyapatite carbonatée (CHA) et le pyrophosphate (PP). L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux et l'association de TO<sub>2</sub>, de MOT ou de PRF pour la régénération osseuse des défauts de calvaria (voûte crânienne). Cette étude a donc pour but de montrer qu'il est possible d'améliorer un procédé d'ITO opératoire afin d'éviter les techniques de greffe osseuse nécessitant un prélèvement osseux contraignant pour les patients en diminuant la morbidité de cette procédure. Cette étude se déroulera sur 5 ans. 141 rats seront nécessaires. Le remplacement de l'animal n'étant pas possible pour cette expérimentation *in vivo*, le nombre d'animal sera divisé par 2. Afin de réduire de moitié le nombre de rat, 2 défauts de calvaria seront réalisés par animal. La réalisation de ces 2 défauts a montré une très bonne tolérance dans les expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. Nous raffinerons les conditions d'hébergement des animaux par un enrichissement des milieux dans chaque cage. Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité expérimentale pour s'assurer du bien être des animaux. Une analgésie sera donnée de façon systématique en per et post-opératoire ainsi qu'en cas de détection de signe de souffrance même mineure.

**8877** Ces dernières années, l'immunothérapie, c'est-à-dire la manipulation du système immunitaire du patient pour combattre la tumeur, a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques. Cependant, seule une partie des patients répondent au traitement par immunothérapie, et de nombreux paramètres peuvent diminuer l'efficacité du traitement. En particulier, le traitement par antibiotiques, qui cause la mort des bactéries de la flore intestinale, diminue fortement les réponses immunitaires contre les tumeurs.

Le but de ce projet est de mieux comprendre l'effet de la flore intestinale dans les réponses immunitaires contre les tumeurs, et de tester des traitements permettant d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie lors de la prise d'antibiotiques.

Cette étude durera au maximum 5 ans. Seuls des tests *in vivo*, dans un organisme entier, permettront d'étudier les relations complexes entre système immunitaire, tumeur et flore intestinale. Nous utiliserons des souris C57BL/6 qui sont un modèle classique et largement accepté par la communauté scientifique internationale pour étudier l'immunité anti-tumorale. Les souris seront traitées par des antibiotiques et nous injecterons des cellules tumorales sous la peau afin de créer une tumeur. Dans le cas des greffes de tumeurs, les animaux sont surveillés quotidiennement pour leur état général et deux fois par semaine pour mesurer la taille de la tumeur afin d'appliquer les points limites décrits dans la procédure. Dans certaines expériences, les souris sous antibiotiques seront également traitées par immunothérapie, avec ou sans un traitement complémentaire que nous aurons préalablement sélectionné grâce à des tests *in vitro*.

Ce projet répond aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Un maximum de 960 animaux sera utilisé pour ce projet. Pour chaque expérience, nous utiliserons le minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables et scientifiquement valides (incluant les groupes contrôles nécessaires). De plus, chaque animal sera utilisé pour analyser plusieurs paramètres des cellules du système immunitaire et de la tumeur, ce qui permettra d'optimiser les données obtenues sur chaque animal. Aucun prélèvement ne sera réalisé sur les souris vivantes. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

**8878** La caractérisation physiopathologique du tube digestif peut parfois nécessiter des systèmes intégrés d'étude sur animaux vivants, afin d'appréhender les réponses de l'organisme par lui-même mais aussi des échanges coordonnés entre plusieurs types cellulaires présents dans le tissu ciblé ou d'autres organes plus distants. C'est notamment le cas de l'intestin, dans sa fonction de barrière par rapport à des agents exogènes (présents dans la lumière) ou endogène, le contrôle de sa perméabilité, de son homéostasie, de sa réponse immunitaire ou de régulation des flux internes d'eau dans le côlon qui peuvent provoquer des diarrhées ou des constipations. Les expériences menées dans ce projet visent à étudier certaines réponses physiologiques digestives sur des rongeurs (rats ou souris) anesthésiés à la fois de façon globale, puisque régulé par l'intestin entier et le reste de l'organisme auquel il est relié par la circulation générale mais aussi de façon analytique puisque des anses intestinales seront individualisées par ligature et remplies par différents traitements stimulant ou inhibant certaines réponses étudiées. Dans cette approche, qui nécessitera l'utilisation de 1008 animaux, une anesthésie à l'isoflurane ou au pentobarbital de sodium sera pratiquée et associée à une analgésie au carprofène, les protégeant de toute sensation douloureuse tout au long de l'étude. Après laparotomie médiane, la fraction d'intestin à étudier sera externalisée, tout en préservant sa structure, son innervation et ses circulations sanguines et lymphatiques, sera lavée et individualisée par une ligature à ses deux extrémités. L'anse ainsi formée sera remplie de différentes solutions comme des produits pro-inflammatoires ou stimulant la sécrétion d'eau dans l'étude des phénomènes diarrhéiques, ou des solutions contenant ou non des produits potentiellement absorbables par l'intestin. La réponse globale, tissulaire ou moléculaire pourra ensuite être étudiée en comparaison à celle d'animaux témoins. Nous nous sommes attachés dans ce protocole à utiliser un nombre restreint d'animaux et d'études visant à caractériser 1) le dialogue entre des produits exogènes ajoutés dans la lumière intestinale et l'intestin lui-même, concernant la régulation de la perméabilité intestinale, 2) l'entrée de ces composés dans la muqueuse intestinale et leur effet sur la réponse immunitaire et 3) la sécrétion d'eau. Les lots d'animaux sont restreints à 16 individus correspondant à 8 animaux traités comparés à 8 animaux témoins répartis sur 4 ans et 4 animaux étudiés par journée expérimentale. Ceci est le minimum requis pour une valeur scientifique quantifiable et suffisante pour des analyses statistiques. Nous utiliserons au total 480 souris (30 lots de 16 souris), réparties sur 4 ans pour caractériser les voies d'absorption intestinale de certains antigènes luminaux : contaminants alimentaires, toxiques (xénobiotiques), de billes de latex ou de microorganismes non pathogènes (bactéries commensales du microbiote). Une autre étude pharmacologique sera effectuée mesurant

l'effet de 11 drogues pour leurs propriétés anti-diarrhéiques sur des lots de 16 rats, pour 11 produits testés comparés à 11 conditions témoins et à chaque fois, une stimulation par 3 agents pro-diarrhéiques, soit 528 animaux répartis sur 4 ans. Cette étude a l'avantage de mesurer sur l'intestin certains aspects physiologiques d'absorption ou de pharmacologie anti-diarrhéique qui associe la nécessité d'un intestin entier, sur animal vivant, des traitements locaux des tissus, tout en constituant des conditions d'anesthésie indolore. Les animaux seront hébergés dans une animalerie aux normes par rapport à la réglementation européenne en vigueur, à une température ambiante constante de 20°C et avec un apport permanent de nourriture et d'eau, et font l'objet d'une surveillance et de soins quotidiens leur assurant les meilleures conditions de bien-être et santé.

**8879** Le développement de thérapies personnalisées et non invasives représente un challenge majeur en cancérologie. L'utilisation de nano-outils multifonctionnels combinés à de nouveaux biomarqueurs spécifiques des cellules cancéreuses apporte une solution de choix. Ces nano-outils ayant démontré des propriétés anti-cancéreuses in vitro pourra faire l'objet d'une évaluation d'activité anti-tumorale dans un modèle animal de type poisson-zèbre (plus particulièrement les embryons transparents) porteur de tumeurs. L'utilisation de ces embryons reste un des meilleurs moyens aujourd'hui de déterminer l'efficacité anti-tumorale des molécules thérapeutiques dans un modèle in vivo.

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est utilisé pour évaluer les propriétés thérapeutiques anti-cancéreuses de nanoparticules innovantes de thérapie ciblée. Le recours à l'animal valide l'intérêt d'une thérapie possédant ces propriétés in vitro. Les embryons poisson-zèbres ont été choisis car ce sont des modèles adaptés et très utilisés en recherche anti-cancéreuse. Le nombre d'embryons de plus de 5 jours qui seront utilisés pendant cette étude qui durera cinq (05) années sera de 7200 à raison de 60 embryons/semaine pendant 24 semaines/année. Le reste du temps sera consacré à l'exploration et à l'analyse des résultats.

Au cours de ce projet, la règle des 3R sera respectée :

Remplacement : L'étude de ciblage des cellules cancéreuses par les nanoparticules vectorisées nécessite des expériences in vivo. Les expériences in vitro ne permettent pas d'explorer la spécificité de ciblage des nanoparticules. C'est pour cette raison que nous proposons d'étudier le ciblage des nanoparticules chez les embryons du poisson zèbre vivant.

Réduction : L'utilisation de l'imagerie permettra de suivre la progression tumorale et d'évaluer l'efficacité de ciblage des nanoparticules en suivant la régression des xénogreffes chez le même embryon. De plus, ce même embryon sera utilisé pour les études d'immunohistochimie. Même si les expériences devront être répétées, cela va réduire considérablement la quantité d'animaux nécessaires.

Raffinement : Les expériences proposées sont de nature peu ou pas invasive et seront effectuées sous anesthésie.

**8880** Dans un futur proche, le nombre et la durée des missions spatiales habitées devraient inexorablement augmenter. En effet, les agences spatiales ont comme projet d'envoyer à plus ou moins long terme des astronautes sur la Lune, Mars ainsi que sur des astéroïdes; tandis que des compagnies privées souhaitent développer une exploitation commerciale de l'espace en proposant des services comme le tourisme spatial et les taxis de l'espace. Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux connaître les effets de la microgravité sur la physiologie humaine. Chez l'homme, le vol spatial provoque une augmentation du stockage du fer associé à une diminution de la biodisponibilité en fer. Ce phénomène contribue au développement de troubles musculaires et osseux ainsi qu'à l'anémie chez l'astronaute. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de ces troubles ne sont pas encore identifiés. Dans ce contexte, l'objectif général de ce projet est mieux comprendre le rôle de l'hepcidine, une hormone hépatique essentielle à la régulation du métabolisme du fer, ainsi que le rôle que peut jouer l'activité musculaire dans ces régulations. Pour répondre à cet objectif, nous avons construit un projet avec une approche translationnelle divisée en 2 volets expérimentaux effectués chez l'homme et le rongeur. Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Déterminer chez l'homme dans quelles mesures la prévention de la perte de masse musculaire par la gravité artificielle peut prévenir la réduction de la biodisponibilité du fer induite par la microgravité



(Volet 1). Cet objectif sera conduit dans le cadre d'un projet mené avec les agences spatiales européennes (ESA) et françaises (CNES)

- Déterminer chez le rongeur les mécanismes par lesquels la prévention de la perte de masse musculaire associée à la microgravité peut moduler la biodisponibilité en fer, avec une attention toute particulière sur la régulation de l'hepcidine et de l'état inflammatoire (Volet 2).

Pour répondre à l'objectif du volet 2, nous avons déjà effectué une expérimentation à l'été 2017. 30 rats Wistar mâles ont été obtenus à l'âge de 5 semaines. Après une semaine d'acclimatation, les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans 3 groupes expérimentaux (n=10 par groupe) : un groupe contrôle (CON), un groupe microgravité et un groupe microgravité mais réexposé aux effets de la gravité 1h/jour. Le protocole de suspension s'est poursuivi pendant 28 jours afin d'observer les effets à long terme de la microgravité. Les résultats obtenus sont prometteurs, mais malgré nos calculs initiaux de Sample Size, l'échantillonnage de 10 animaux par groupe demeure insuffisant pour valider certaines de nos hypothèses de travail malgré de très fortes tendances significatives par notre approche statistique (variation de la biodisponibilité en fer notamment). Notre présente demande vise à reproduire cette expérimentation avec 15 animaux supplémentaires réparties dans les 3 groupes expérimentaux précédemment cités passant le nombre d'animaux par groupe de 10 à 15.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Ainsi, les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages individuelles, accolées et transparentes, pour réduire la sensation d'isolement. De plus, les cages sont munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par le modèle expérimental. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour vérifier les meilleures conditions de bien être possible (Raffinement). Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure (Réduction). Enfin, par l'intermédiaire de ce protocole expérimental, nous pourrions déterminer de changements physiologiques au sein des tissus musculaires et hépatiques donc seulement observables dans un modèle in vivo (Remplacement).

**8881** Notre équipe cherche à lutter contre les infections bactériennes survenant chez les patients atteints de mucoviscidose. Nous travaillons sur une mycobactérie : *Mycobacterium abscessus*, qui, lorsqu'elle infecte ces patients, entraîne des infections aiguës et chroniques difficiles à traiter. La présence de cette bactérie est même une contre-indication à la greffe pulmonaire dans certains pays. Nous sommes impliqués maintenant depuis plus de 10 ans dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre cette bactérie chez ces patients. Notre équipe a déjà travaillé sur des modèles murins, ce qui lui a permis de réduire et connaître précisément le nombre d'animaux que l'on doit utiliser lors d'une infection, ou lors d'un protocole vaccinal, et le projet que nous proposons ici bénéficie des différentes études précédemment réalisées.

Au cours de nos études, nous avons également essayé de travailler sur d'autres modèles animaux (poisson zèbre -*Danio rerio*, drosophile) dans le cadre de solution de remplacement. L'inconvénient majeur de ces modèles est qu'ils ne permettent pas d'étudier la réponse immunitaire protectrice dans son intégralité. C'est pour cela que nous souhaitons continuer à travailler sur la souris (ici notre choix se portera sur la souris C3HeB/FeJ). Cette étude ne peut être réalisée que chez la souris, car elle possède tous les types de réponse immunitaire qui nous permettront d'évaluer de nouveaux vaccins. Par infection, nous utilisons 5 souris par groupe, et nous effectuons 5 points (Jour1 ; Jour7, Jour15 Jour30, et Jour45) ; soit 25 souris par condition. Lors d'une vaccination, nous procédons de manière similaire sauf que nous devons ajouter une population de souris contrôle non vaccinées. Ce qui nous fait 50 souris par protocole de vaccination. Nous prévoyons de réaliser 4 protocoles d'infections par an (100 souris) et 2 protocoles de vaccination par an (100 souris), soit un total de 200 souris par an (1000 souris au total pour les 5 ans du projet).

Nous suivons strictement les règles de raffinement, aussi bien en termes d'anesthésie avant l'infection, lors du suivi jusqu'au réveil des animaux, ainsi que lors du suivi sur toute la durée du protocole. Nous suivons également strictement les conditions d'euthanasie des animaux afin de

réaliser les comptages bactériens par organe (poumons, foie et rate). Les animaux seront hébergés au sein de notre animalerie pour laquelle les conditions d'hébergement ont été reconnues. Notre but est sincèrement de trouver de nouveaux moyens de traiter les patients atteints de mucoviscidose et présentant cette infection bactérienne. Seul ce modèle développé par notre équipe depuis de nombreuses années nous permettra de nous attaquer à ce problème, voire à le résoudre.

**8882** L'étude de maladies héréditaires dans les populations consanguines d'animaux d'élevage peut permettre l'identification de nouveaux gènes dont l'implication dans des maladies comparables chez l'homme n'était pas connue.

Il arrive en effet qu'on découvre que la mutation responsable d'une maladie héréditaire affecte un domaine précis d'un gène pour lequel aucun mutant n'a encore été décrit chez la souris et l'homme. Dans cette situation, l'étude de ce gène candidat dans des cohortes de patients humains présentant les mêmes symptômes peut permettre d'identifier de nouvelles mutations causales tandis que la création et l'étude de souris génétiquement modifiées peuvent permettre, en laboratoire, de mieux décrire les conséquences phénotypiques de cette mutation. Le décryptage des mécanismes moléculaires sous-jacents offre également des perspectives pour la mise au point de nouveaux traitements thérapeutiques.

L'étude du gène MTCL1 chez la souris, décrite dans ce projet, fait suite à l'identification dans ce gène de deux mutations responsables de crises d'épilepsie sans lien apparent avec d'autres maladies, en races bovines Hereford et Parthenaise. Le but du projet est i) de vérifier si ce gène a les mêmes propriétés dans d'autres espèces et ii) de décrire finement les mécanismes moléculaires associés.

Le choix de la souris est justifié par : i) la bonne connaissance de la génétique de cette espèce et l'abondance d'outils pour son étude, ii) ses caractéristiques de reproduction avec une forte prolificité associée à un faible intervalle de génération et iii) l'efficacité des outils disponibles pour modifier son génome, iv) sa facilité de manipulation et sa faible taille par rapport au bovin, facilitant les examens cliniques. La méthode envisagée permet de limiter le nombre d'animaux en expérimentation, par des croisements raisonnés permettant l'obtention conjointe des souris invalidées au gène détruit et de leurs contrôles au gène intact. Ainsi, 220 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir des effectifs suffisants pour mener des analyses statistiques pertinentes nécessaires pour l'exploitation des résultats. Les principaux caractères analysés chez ces souris seront : la croissance (par l'intermédiaire du poids), l'étude des causes et de la fréquence de survenue des crises épileptiques dans un environnement normal d'élevage, l'effet de stimuli auditifs, visuels et chimiques sur le déclenchement des crises épileptiques, la mémorisation et l'exploration du territoire, l'activité électrique du cerveau d'un nombre limité de souris et le vieillissement. L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine des crises épileptiques nécessitera des prélèvements post-mortem d'échantillons du système nerveux central et de muscles. Cette étude permettra de mieux comprendre l'origine des crises épileptiques présentées par ces souris et d'appréhender les voies thérapeutiques envisageables.

Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (sopalin, rouleaux de cartons). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience afin d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté.

**8883** La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013- 118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent.

Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'aux personnes souhaitant maintenir leurs compétences techniques, la possibilité de réaliser des injections intracérébrales. Cette formation continue permet ainsi aux expérimentateurs de rester compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut nécessitant de la stéréotaxie dans les meilleures conditions pour les animaux.

L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement que chez la souris. En effet, la stéréotaxie est une technique d'injection qui permet d'atteindre des points précis dans le cerveau. Il s'agit donc d'une chirurgie qui ne peut être apprise autrement que sur l'animal.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, les animaux seront systématiquement des animaux de réforme. Nous estimons à 400 souris le nombre maximum nécessaire sur 5 ans pour assurer la formation pratique à la stéréotaxie.

Les injections stéréotaxiques seront réalisées sous anesthésie, avec une couverture antalgique adaptée. Du gel ophtalmique sera utilisé pour prévenir le dessèchement de la cornée et les souris seront placées sur un tapis chauffant jusqu'à leur réveil complet.

**8884** La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des dystrophies musculaires (DM) et concerne 1 garçon nouveau-né sur 3500. C'est une maladie génétique récessive liée au chromosome X qui résulte d'une mutation sur le gène de la dystrophine à l'origine de l'absence complète de la protéine dans les fibres musculaires. Cette absence entraîne une dégénérescence des fibres et à terme le remplacement du tissu musculaire par du tissu fibreux et adipeux. Cliniquement, une atrophie musculaire et une faiblesse musculaire progressive sont observées conduisant au décès des patients vers l'âge de 20-30 ans. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif de la DMD. La thérapie cellulaire fait partie des orientations thérapeutiques prometteuses. L'identification récente de plusieurs populations de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur potentiel myogénique offrent des perspectives nouvelles de stratégie thérapeutique des maladies neuromusculaires, parmi lesquelles les DM.

Dans ce contexte, notre équipe a isolé une population de cellules souches dérivées du muscle squelettique (cellules MuStem) et établi la preuve de son efficacité thérapeutique chez le chien dystrophique, modèle cliniquement pertinent de la DMD. Après injection systémique, une stabilisation persistante de l'état clinique des chiens ainsi qu'une augmentation de l'activité de régénération des fibres ont été observées. Un programme de recherche pré-clinique a ensuite abouti à l'isolement de cette population chez l'Homme (hMuStem) qui présente des propriétés phénotypiques et comportementales in vitro similaires à celles décrites pour la population canine. L'ensemble de ces données positionne la population MuStem comme potentiel médicament innovant dans le traitement de la DMD et plus globalement dans le domaine des DM.

L'objectif du projet présenté ici est de déterminer le comportement in vivo de la population hMuStem après administration intramusculaire chez la souris dans un contexte de DM. Un intérêt particulier sera porté sur l'incidence du temps d'expansion in vitro de l'agent cellulaire en regard de ses propriétés de transplantation dans la mesure où des travaux précédemment réalisés sur des précurseurs myogéniques laissent entrevoir un impact négatif de la culture cellulaire en terme de survie et de contribution à la formation de fibres musculaires. Par ailleurs, l'effet d'une stimulation cytokinique sur le comportement de greffe des cellules hMuStem sera évaluée dans la mesure où les cytokines TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  ont été présentées comme jouant sur l'expression et/ou la sécrétion par les cellules souches mésenchymateuses de nombreux facteurs impliqués dans le processus d'intégration des cellules dans les tissus hôtes ainsi que sur leur capacité de migration.

Le choix d'un modèle animal immunodéficient est indispensable puisqu'il s'agit de tester des cellules humaines. De même, l'utilisation d'un modèle immunodéficient et dystrophique est requis pour analyser le devenir des cellules humaines dans un contexte pathologique. Pour cela le muscle Tibialis anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de la procédure d'injection. Les groupes seront constitués de 4 ou de 7 animaux pour obtenir des résultats statistiques exploitables dans le respect de la règle des 3R. Afin de réduire le nombre de souris utilisées les deux TA de chaque souris seront injectés. La faisabilité de cette approche (il n'y a pas d'interférence expérimentale entre l'injection de deux TA) a déjà été publiée. Afin de comparer les groupes de cellules, nous réaliserons une analyse statistique.

Au total, 165 souris immunodéficientes Rag2-Il2rb- (n=96) et immunodéficientes/dystrophiques Rag2-Il2rb-Dmd- (n=69) seront utilisées comme suit :

- Etape 1 : Evaluation du comportement de greffe des cellules hMuStem soumises à différents temps d'expansion in vitro : injection intramusculaire des cellules hMuStem dans le muscle lésé (dommage par le froid) de souris Rag2-Il2rb- (n=96)
- Etape 2 : Preuve de concept avec les cellules hMuStem administrées intra-musculairement chez la souris Rag2-Il2rb-Dmd- (n=48)
- Etape 3 : Evaluation de l'effet d'une stimulation par les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  sur le comportement de greffe des cellules hMuStem après administration intra-musculairement chez la souris Rag2-Il2rb-Dmd- (n=21)

Concernant le raffinement (application de la règle des 3R), le bien-être animal passera notamment par :

- (1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (cages équipées de mezzanine et mise à disposition d'éléments d'enrichissement comme des carrés de coton, des tunnels en carton, des sizzle dry (papier) et des morceaux de bois).
- (2) un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement),
- (3) l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative),
- (4) une réactivité accrue du personnel animalier avec la mise en place d'une grille de scoring de la douleur dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates (Cf. exemple annexe de la saisine)
- (5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie et analgésie si nécessaire)

La finalité de la démarche expérimentale est de renseigner le potentiel thérapeutique de cette population de cellules hMuStem et les modalités de préparation in vitro de celle-ci, lesquels permettront de constituer des données pré-cliniques majeures en vue de son éventuelle utilisation en médecine régénérative pour le traitement de la DMD.

**8885** Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur les acouphènes et la perte d'audition. La perte d'audition et les acouphènes sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des troubles auditifs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une perte d'audition pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité. Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ». Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la Recherche pré-clinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

Le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an. On l'estime à un maximum sur 5 ans de 5730 rats/cobayes et 1000 souris.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

**Réduire** : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

**Raffiner** : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ».

**Remplacer** : L'analyse de l'état de l'art de la recherche pré-clinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

**8886** Chez le porc, la grippe est une affection respiratoire touchant près de la moitié des élevages français. Cette infection virale a des conséquences sanitaires et économiques importantes pour la filière porcine, mais a également un impact en termes de santé publique. En effet, les virus influenza ont un caractère zoonotique, c'est-à-dire qu'ils peuvent se transmettre de l'animal à l'homme. Ces dernières années, la surveillance des virus influenza porcins dans les élevages de porcs français a montré l'émergence d'un nouveau virus H1N2 suite à un phénomène dit de « glissement antigénique ». Le séquençage de ce variant antigénique a en effet permis de montrer qu'il dérive du virus H1N2 qui circule chez le porc en France depuis les années 90, des modifications génétiques étant apparues dans son génome. La proportion d'isolats de ce nouveau variant, comparativement aux isolats du virus parental, a augmenté progressivement jusqu'à représenter la moitié des souches H1N2 détectées sur le territoire en 2014-2015, mais peu d'informations sont disponibles actuellement sur sa pathogénicité et son échappement potentiel à la couverture vaccinale.

Ce projet expérimental a deux objectifs : 1/ comparer les réponses de porcs infectés par le virus variant à celles observées chez des porcs infectés par le virus H1N2 parental et, 2/ évaluer la protection conférée par le seul vaccin actuellement disponible sur le marché français vis-à-vis de cette souche variante. Pour cela, 5 porcs seront inoculés par une souche H1N2, 5 seront inoculés par une souche H1N2 variante et 5 autres porcs recevront du milieu de culture et serviront de témoins. Ce même dispositif sera dédoublé pour être appliqué sur des animaux préalablement vaccinés contre la grippe du porc. Ainsi, les paramètres cliniques, immunologiques et virologiques seront étudiés sur un total de 30 animaux, nombre minimal d'animaux à utiliser pour répondre aux objectifs de l'étude. L'expérimentation sera conduite dans le respect de l'éthique et du bien être des animaux. Dans un souci de raffinement, un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal au quotidien et les animaux seront anesthésiés lors de prélèvements pouvant entraîner de la souffrance. Si une altération importante de l'état de santé était notée (modification sévère de la température corporelle ou perte de poids anormalement élevée par exemple), les animaux concernés seraient euthanasiés après anesthésie.

Ce projet ne peut se faire sans un recours à l'expérimentation animale mais des travaux menés in vitro par ailleurs permettront de compléter les données obtenues ici afin d'apporter de nouvelles connaissances sur ce variant antigénique.

**8887** Les rayonnements ionisants (RI) impactent directement la santé des organismes vivants. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de faibles doses de RI sur le cerveau adulte d'un animal vertébré, le poisson zèbre. Les RI ont un impact significatif sur les fonctions cognitives et motrices des animaux vertébrés pouvant, en condition chronique d'exposition, potentiellement impacter la santé des populations. Un nombre croissant de données montrent que les RI affectent non seulement les neurones différenciés mais également les capacités de proliférations des cellules souches. Les RI

produisent une accumulation de mutations génétiques dans les cellules souches pouvant perturber leur fonctionnement et aboutissant à une perte progressive des capacités de renouvellement cellulaire s'apparentant au processus de vieillissement prématuré. Ce projet nécessite l'obtention de tissus adultes dérivés d'animaux fraîchement exposés aux irradiations gamma. Le processus biologique étudié est un mécanisme observable uniquement sur des spécimens de poissons zèbres adultes vivants. La seule solution est donc d'effectuer ce projet sur des animaux vivants. Le poisson zèbre fait partie des animaux vertébrés ayant conservé une grande capacité de régénération au stade adulte, ce qui en fait un modèle biologique d'intérêt majeur pour l'acquisition de connaissances sur la neurogenèse adulte. Ce protocole a pour but d'utiliser 400 poissons zèbre adultes pour l'étude de 5 doses faibles de RI en condition chronique d'exposition (dont un contrôle non exposé) sur i) des embryons de poisson zèbre âgés de moins de 5 jours et ii) sur des animaux adultes (âgés de 4 à 6 mois) lorsque le processus de régénération est en cours.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables statistiquement. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (suivi et observations des animaux, protocole d'anesthésie).

**8888** Ce projet concerne l'évaluation de produits immunologiques destinés à protéger une espèce de carnivore domestique contre certaines maladies infectieuses virales dès la première injection vaccinale.

La mise en œuvre de ce projet comporte trois procédures expérimentales répétitives permettant d'évaluer l'efficacité de chacun des produits testés pour chacune des trois valences d'intérêts après une seule injection vaccinale.

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

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire d'être conduite sur l'espèce de destination du produit;
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé en conformité avec la réglementation et dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 260 carnivores domestiques sur 5 ans sera impliqué dans ce projet ;
- un hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissement de manière à limiter le stress ;
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;
- une adaptation du type de nourriture afin de faciliter l'alimentation et l'hydratation des animaux.
- des points limites adaptés et précisément définis afin d'éviter toute souffrance des animaux.

**8889** L'objectif du projet est de sensibiliser les étudiants à des techniques comportementales permettant l'évaluation de la mémoire.

Il s'agit d'une formation à l'expérimentation animale réservée aux étudiants inscrits en 1ère année du master dans le domaine de la biologie. L'objectif pédagogique majeur est de former à l'expérimentation animale des étudiants appelés à manipuler les animaux et à participer directement aux expériences sur l'animal. Les étudiants seront sensibilisés à deux techniques comportementales : le conditionnement aversif de type peur conditionnée et l'évaluation de l'anxiété grâce au dispositif du labyrinthe en croix surélevé. La souris représente l'espèce de choix pour l'étude des processus mnésiques et donc pour ce projet.

Par définition, ce projet ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus. L'espèce animale choisie est la souris et ayant conscience de la nécessité de réduire au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en conservant une signification pédagogique. Une souris sera attribuée à chaque binôme d'étudiants (en général chaque année, la formation compte 48 étudiants) et chaque binôme apprendra à manipuler l'animal et sera sensibilisé à l'utilisation des dispositifs expérimentaux et des procédures comportementales associées. Le nombre total de souris utilisé sera de 96 sur la durée totale du projet de 4 ans.

Nos expériences ont été conçues et raffinées en optimisant les informations obtenues sur chaque souris et en veillant au bien être animal à chaque étape. Des points limites et critères d'interruption sont observés tout au long de nos procédures afin de veiller au bien être des animaux.

**8890** La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une pathologie humaine létale et rare, dans laquelle on observe une dégénérescence et donc une disparition progressive des neurones du cortex moteur et de la corne antérieure de la moelle épinière. Ceci induit des paralysies pouvant toucher les muscles des membres ou de la sphère ORL (et conduire à un handicap sévère) et/ou une atteinte respiratoire (par paralysie du muscle diaphragmatique) qui est le plus souvent responsable de complication mortelle. Si la majorité des malades n'a aucune anomalie génétique, environ 5% des patients sont atteints d'une forme familiale notamment liée à des mutations sur le gène d'une protéine appelée la Super Oxyde Dismutase1 (SOD1). Dans l'objectif d'étudier les mécanismes de la maladie et de développer de nouveaux traitements, un modèle murin de cette maladie a été développé. Ces animaux contiennent un transgène humain muté codant pour la SOD1 et développe une pathologie dégénérative motrice pure qui possède beaucoup d'analogie avec la pathologie humaine. Cette lignée transgénique animale est, à ce jour, le modèle animal le plus utilisé pour la recherche sur la SLA. Notre objectif est de constituer un élevage de ces animaux qui seront utilisés pour différents projets de recherche. Un total de 1387 animaux est prévu pour l'ensemble des projets issus de cet élevage. Pour toutes ces recherches la règle des 3R sera strictement respectée. Ainsi le nombre d'animaux produit par cet élevage correspond très exactement à tous les projets de recherche qui ont été déclarés par les établissements expérimentateurs. Par ailleurs, les souris produites par l'élevage seront transmises à l'établissement expérimentateur avant l'apparition des symptômes de la maladie. Aucune douleur, souffrance ou angoisse n'est donc infligée aux animaux. Par ailleurs, les cages sont enrichies avec des nids de coton afin de veiller au bien être des animaux.

**8891** La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

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

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

L'objectif de notre projet est d'évaluer pour la toute première fois la tolérance locale et l'efficacité sur la cicatrisation d'un tout nouveau dispositif médical issu d'un programme européen et utilisant les effets thérapeutiques de la lumière visible pour améliorer le processus d'auto-guérison et pour surveiller l'état de la plaie pendant la thérapie. Le dispositif médical est constitué de 2 parties : un pansement jetable avec un système d'éclairage mince et flexible permettant d'irradier la plaie dans la partie bleue du spectre de la lumière (450-495 nm) connue pour avoir des effets antimicrobiens et d'induire une accélération de la croissance cellulaire des kératinocytes et des fibroblastes selon les tests in vitro effectués, avec également des capteurs intégrés pour la surveillance de la température

et de l'oxygénation du sang au niveau de la plaie, et un petit module électronique pour le contrôle, l'acquisition de données et la communication sans fil.

Pour ce projet qui constitue la toute première évaluation de ce nouveau dispositif médical, nous n'utiliserons que 20 rats mâles Wistar d'un poids de 275-300 g (10-12 semaines d'âge) répartis en 2 groupes de 10 rats chacun (Réduction). Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, une plaie cutanée sera induite, sous anesthésie gazeuse, par excision cutanée sur le dos de l'ensemble des animaux (Procédure 1). Un pansement sera appliqué sur la plaie cutanée induite, avec un renouvellement 2 fois par semaine jusqu'à cicatrisation complète. Pour le groupe traité ce pansement comprendra le système d'éclairage permettant une irradiation quotidienne au large de la plaie cutanée induite, sans nécessité d'anesthésier les animaux, alors que pour le groupe contrôle, ce pansement comprendra le système d'éclairage mais aucune irradiation ne sera réalisée (Procédure 2). Des observations quotidiennes de la plaie cutanée induite et du tissu cutané environnant avant et après traitement permettront d'étudier la tolérance de ce pansement et des irradiations réalisées. Des paramètres seront ainsi scorés quotidiennement au niveau de la plaie cutanée induite et du tissu cutané environnant, ainsi que le comportement des animaux, la détermination de la surface de la plaie cutanée, avec prise de photos régulières, sans nécessité d'anesthésier les animaux (Procédure 3).

Les animaux seront placés en cage individuelle (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour éviter qu'ils ne s'arrachent entre eux le dispositif médical testé, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques en bois à rogner (briques d'Aspen) seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien être (Raffinement).

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

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

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro pour évaluer la tolérance et l'efficacité d'un tel dispositif sur des plaies cutanées chroniques (Remplacement).

**8892** Le projet vise à démontrer les conséquences sur la fertilité des lapines de l'inactivation du gène BCAR4 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 4).

Au cours des premiers jours de développement, l'embryon utilise les produits de gènes (ARN et protéines) reçus en héritage de la mère via l'ovocyte dont il est issu. Il s'agit de comprendre le rôle de ces facteurs dans le développement embryonnaire. Il a récemment été montré, en utilisant la fécondation in vitro chez la vache, que le gène BCAR4, est exprimé dans l'ovocyte et l'embryon et est important pour les premiers jours du développement embryonnaire. L'objet du présent projet est de démontrer le rôle de ce gène dans le développement de l'embryon in vivo, par inactivation du gène chez la mère.

Des lapins présentant ou non une altération du gène sont nés dans l'établissement. Des mâles seront utilisés comme donneurs de semence à congeler en vue de conserver la lignée. Les femelles dont le gène aura été invalidé seront caractérisées sur plusieurs paramètres liés à la reproduction par des méthodes non ou peu invasives (dosage hormonaux, expression comportementale de la réceptivité au mâle, établissement de gestation, taille de portée...); les femelles non porteuses de mutations seront les contrôles. Dans un deuxième temps l'ovulation, la fécondation et le développement embryonnaire précoce seront spécifiquement étudiés, ce qui nécessitera l'euthanasie des animaux.

Le projet est conçu avec le souci de respecter la règle des 3R :

1) remplacement : il y a eu démonstration préalable sur le développement embryonnaire in vitro ;



2) réduction : Le nombre total de 44 animaux d'intérêt (40 femelles avec un gène invalidé ou contrôles, ainsi que 4 mâles pour la production de semence) a été fixé au minimum pour atteindre une pertinence scientifique et statistique.

3) raffinement : Le gène n'existant pas chez la souris, le lapin a été choisi comme modèle expérimental. Les lapins sont élevés en respectant la réglementation en vigueur et permettant un espace minimum vital pour chaque individu, avec un tasseur de bois à ronger. Les procédures sont peu invasives, avec recours à l'anesthésie locale pour les prises de sang. Les animaux sont suivis quotidiennement par des animaliers. Aucune pathologie n'est attendue puisque le phénotype concerne le développement embryonnaire, le projet devrait donc être sans gravité pour la santé des animaux.

Ce projet de recherche fondamentale rejoint des préoccupations médicales, puisque des anomalies de ce gène pourraient être à l'origine d'infertilité féminine.

**8893** Le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une résistance de l'organisme à l'insuline, est associé au développement de divers troubles du système nerveux central dont des troubles de la mémoire et du comportement émotionnel (anxiété, dépression). L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le développement des troubles de la mémoire et de la dépression fréquemment associé au DT2. Est-ce qu'une résistance à l'insuline dans des régions cérébrales clefs de régulation de la mémoire et des émotions est impliqués dans les troubles cérébraux associés au DT2?

Un moyen expérimental de générer une insulino-résistance local est de rendre inactif le récepteur à l'insuline (IR) sélectivement dans une région cérébrale. Des études d'hybridation in situ ont montré la présence de l'IR dans les régions du cerveau régulant la mémoire et le comportement émotionnel tels que l'hippocampe et le Raphé dorsal. Ainsi, le but de ce projet est déterminé si la délétion de l'IR sélectivement dans l'hippocampe et le Raphé dorsal induit le développement de troubles cognitifs et des émotions.

Ce projet de 2 ans sera réalisé sur 96 souris. L'étude de comportements anxio-dépressifs ou de la mémoire ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur et l'inconfort des animaux. La chirurgie par stéréotaxie nécessaire à l'invalidation de l'IR sera réalisée sous anesthésie avec une prise en charge optimale de la douleur par l'injection préalable d'antalgique. Toutes les précautions d'asepsie et de confort seront prises pour limiter l'inconfort des animaux (application d'un gel ophtalmique, opération sur tapis chauffant, réhydratation post-chirurgie).

**8894** Les leucémies sont la cause d'une grande part des décès liés à un cancer chez les enfants. Nous savons que les cellules leucémiques ont des besoins énergétiques accrus par rapport aux cellules normales, nécessaires à leur division très rapide. Cette énergie est produite à partir de nutriments, qui sont importés dans les cellules par des protéines transporteuses spécialisées. Or la production de ces transporteurs de nutriments est dépendante d'un complexe protéiques appelé Sec61. Notre hypothèse de travail est que le blocage de Sec61 pourrait représenter un moyen efficace de stopper sélectivement le développement tumoral. A l'appui de cette hypothèse, nous avons démontré qu'un facteur bactérien qui bloque Sec61 altère dramatiquement la viabilité et la division de cellules leucémiques en culture. Il reste à démontrer que c'est également le cas dans un organisme entier. Il est à noter que ce facteur a des propriétés analgésiques, et qu'à la concentration et à la fréquence où nous l'utiliserons il n'a pas d'effets toxiques connus chez la souris. Les résultats de notre étude pourraient révéler une nouvelle molécule anti-cancéreuse, capable d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies.

La règle des 3R, qui vise à « Remplacer, Réduire et Raffiner » l'usage des animaux sera respectée : Le nombre de souris à utiliser a été calculé au plus juste avec l'objectif de réduire le nombre d'animaux autant que possible tout en minimisant le « bruit de fond » inhérent à la recherche biologique in vivo. Ce nombre tient compte d'un minimum de cellules à collecter pour l'analyse et inclut pour chaque série d'expériences le nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la

nécessité de reproduire les résultats, afin de pouvoir identifier et exclure des artéfacts expérimentaux et ainsi des erreurs d'interprétation. Les animaux seront utilisés dans des procédures de gravité modérée et « sans réveil ». Nous raffinerons au mieux les procédures expérimentales : utilisation d'imagerie (non invasive) dès que possible pour suivre l'évolution des tumeurs avec un suivi quotidien des animaux hébergés dans des animaleries agréées. L'imagerie se fait sous anesthésie gazeuse (isoflurane) permettant un réveil très rapide de l'animal (de l'ordre de la minute) avec un stress limité et ne porte pas atteinte aux organes. Les lymphomes étudiés sont des tumeurs circulantes qui ne provoquent pas de gêne chez l'animal par le développement de leur grosseur. Pour le suivi journalier des animaux, nous utiliserons une table de scores cliniques (description des signes cliniques qui apparaissent avec l'évolution de la maladie) et procéderons à l'euthanasie de l'animal si atteinte d'un score 2 ou de la somme de 3 signes de score 1, afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Pour la durée du projet nous estimons à 1659 le nombre de souris nécessaire à leur réalisation.

**8895** L'implantation d'un cathéter veineux chez le porcelet est actuellement réalisée par voie chirurgicale, sous anesthésie générale. L'implantation d'un cathéter par voie chirurgicale est une méthode maîtrisée, occasionnant peu de douleur et permettant de réaliser des prélèvements de sang de manière répétée sur une longue durée (plusieurs semaines). Elle possède cependant le défaut de causer des dommages aux tissus et aux vaisseaux sanguins, ce qui engendre une inflammation locale au site d'implantation du cathéter. Quelques publications ont décrit une méthode alternative d'implantation de cathéter, non invasive, par voie percutanée, ayant pour intérêt d'engendrer peu de dommages aux tissus et donc de minimiser l'induction d'une réponse inflammatoire locale. Par ailleurs, la méthode permet de réduire la douleur chez l'animal et de limiter l'utilisation post-opératoire d'analgésiques. Le projet vise à développer la méthode d'implantation de cathéter veineux par voie non-chirurgicale (percutanée) chez le porcelet non sevré. Cette mise au point a pour but final de pouvoir mesurer les paramètres inflammatoires et immunitaires au niveau sanguin de manière répétée dans le temps et en limitant le biais initialement causé par l'implantation d'un cathéter par voie chirurgicale. Le protocole comprend 6 porcelets de 21 jours d'âge et 6 porcelets de 35 jours d'âge, suivis pendant quatre semaines. Un cathéter sera implanté, soit par voie chirurgicale (méthode actuelle ; 4 porcelets de 21 ou 35 jours d'âge), soit par voie percutanée (méthode non-chirurgicale ; 8 porcelets de 21 ou 35 jours d'âge). La durée de l'intervention sera chronométrée pour chaque porcelet afin de comparer les deux méthodes d'implantations. L'état de santé, le comportement et la croissance des animaux seront suivis quotidiennement afin d'évaluer l'impact de l'implantation percutanée du cathéter sur ces paramètres. L'état général et la fonctionnalité du cathéter sera évaluée quotidiennement pendant quatre semaines après l'intervention. Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux a été déterminé sur la base d'essais antérieurs afin de comparer le temps d'intervention et la durée de fonctionnement du cathéter entre la méthode chirurgicale et la méthode par voie percutanée. Remplacement : l'implantation d'un cathéter ne peut être réalisée autrement que sur un animal vivant. Raffinement : l'implantation d'un cathéter par voie percutanée permettra le prélèvement quotidien de sang sans induire de souffrance ni de stress à l'animal. La méthode mise au point permet de réduire considérablement le temps nécessaire à la mise en place du cathéter et le protocole d'analgésie post-opératoire. L'utilisation d'un logement en cages individuelles en post-sevrage est nécessaire afin d'éviter la détérioration du cathéter par les congénères. Les cages dans lesquelles seront hébergés les animaux seront équipées de barreaux ajourés et seront placées dans la même pièce afin de maintenir un contact visuel, auditif, olfactif et tactile entre les porcelets. Les dimensions des cages assurent à l'animal la possibilité de se déplacer librement.

**8896** L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, causé par un infarctus (accident dit ischémique) ou une hémorragie (accident dit hémorragique) au niveau du cerveau, empêchant un apport sanguin suffisant vers ce-dernier. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale, comme l'IRM (technique de choix). Après un accident vasculaire cérébral ischémique, survient une élévation rapide mais transitoire du glutamate dans l'espace extracellulaire, suivie d'une augmentation marquée du calcium intracellulaire, ce qui provoque une mort neuronale à travers un mécanisme d'excitotoxicité. Par

conséquent, les antagonistes du calcium et du glutamate ont été largement étudiés comme agents protecteurs dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale avec des résultats encourageants. Malheureusement, ils ont échoué ou ont affiché des effets néfastes graves lorsqu'ils ont été testés dans des essais cliniques. Néanmoins, en raison du rôle central du glutamate dans la cascade ischémique, l'atténuation de l'excitotoxicité du glutamate demeure l'une des stratégies les plus prometteuses pour le développement de traitements efficaces pour minimiser les dommages neurologiques suite à un AVC ischémique aigu. Dans ce sens, de nouvelles approches thérapeutiques visent à réduire l'augmentation des taux de glutamate qui intervient immédiatement après la phase aiguë de l'ischémie.

La majorité des essais cliniques a échoué au moment de la translation clinique en raison des trop grandes différences entre le modèle Rongeur de l'AVC et la réalité clinique. Le modèle Primate est donc un modèle de choix pour ces études. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le Primate Non-Humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiopathologiques chez l'Homme en réponse à un AVC.

Ce projet prévoit donc de mettre en place un modèle d'AVC ischémique par thromboembolie chez le macaque afin d'évaluer, dans une étude ultérieure, l'efficacité d'une molécule d'intérêt visant le glutamate et ayant déjà fait ses preuves chez le Rongeur.

Raffinement :

Ce projet prévoit 10 animaux qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. L'intervention chirurgicale pour la création du modèle sera effectuée par un chercheur expérimenté ayant déjà réalisé le même type de procédure précédemment, en veillant particulièrement à la prise en charge de la douleur à l'aide de puissants morphiniques. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux, lorsque possible, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Réduction :

Le nombre de 10 animaux a été choisi pour le réduire au minimum, tout en obtenant des données scientifiquement interprétables. Ainsi, dans un 1er temps, 4 animaux au maximum seront nécessaires pour le raffinement des méthodes de chirurgie (procédure sans réveil). Puis, dans un second temps, 6 animaux au maximum seront nécessaires pour la caractérisation du modèle qui inclura, en plus de la chirurgie, un suivi en imagerie, des neuroscores et des tests neurofonctionnels.

**8897** Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est le trouble endocrinien le plus présent chez les femmes en âge de procréer. Il se caractérise par la présence de nombreux kystes bloquant toute ovulation sur les ovaires. Pour relancer l'activité ovarienne et permettre une grossesse, de nombreuses patientes ont recours à une chirurgie appelée drilling ovarien, qui consiste à détruire du tissu ovarien avec un courant électrique (réalisée par cœlioscopie). Cette méthode, démontrée et reconnue comme efficace depuis sa mise au point il y a plus de 25 ans, permet de rétablir un équilibre hormonal normal des ovaires. Elle reste toutefois assez invasive et ne peut se faire sans hospitalisation. Nous avons développé un système dont le but est de reproduire les résultats du drilling ovarien via un accès moins invasif, basé sur l'utilisation d'une aiguille utilisée de façon routine pour prélever des ovocytes avant une fécondation in vitro (Ovum Pick-Up). La procédure consiste,

par voie transvaginale échoguidée, à appliquer rapidement un très faible courant électrique au niveau de l'ovaire, afin de détruire du tissu et réduire le volume de l'ovaire. Nous souhaitons valider ce nouveau procédé sur des ovaires de vache à la fois ex vivo et in vivo. En effet, les ovaires de vaches sont très similaires en termes de taille et caractéristiques aux ovaires humains. Nous utiliserons un nombre total de 20 vaches de réformes non gestantes pour valider ce nouveau procédé et étudier une semaine, un et deux ou trois mois après la cautérisation ses conséquences en terme de cicatrisation au niveau de l'ovaire. Le protocole expérimental, qui comprend une procédure classée comme légère, respecte la règle des 3R : Remplacement : Pour évaluer les réponses physiologiques concernant les effets volumiques et la cicatrisation de l'ovaire, il faut disposer des mesures sur les animaux vivants et le modèle le plus adapté de par la taille des ovaires est la vache dans notre protocole. Réduction : Cette étude possède un caractère exploratoire, cependant des études ex vivo sur ovaires de vache d'abattoir ont été réalisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Des expérimentations sur banc d'essai ont d'ailleurs aussi été réalisées dans le passé afin de minimiser l'utilisation d'animaux. Enfin, au cours du protocole il sera possible de décider selon les résultats obtenus à 30 (puis à 60) jours si des expérimentations supplémentaires sont nécessaires à 60 (puis à 90) jours. Raffinement : Les vaches utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue et hébergées dans une stabulation sur une aire paillée répondant aux enjeux du bien être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, accès à des brosses latérales et dorsales). De plus, un anesthésique local sera administré permettant une situation de confort optimum de la femelle lors de la cautérisation ovarienne.

**8898** Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules est important pour leurs applications futures in vivo. Or toutes ces applications portent un danger dû à l'accumulation ou à la toxicité des nanoparticules. Il n'existe pas pour l'instant de stratégie permettant d'éliminer les nanoparticules de l'organisme une fois que leur rôle thérapeutique a été accompli. Le but de ce projet est de développer une stratégie visant à contrôler la biodisponibilité des nanoparticules et d'empêcher ainsi leur accumulation dans les organes. Nous proposons ainsi de profiter du caractère non-invasif et inerte des réactions chimiques dites « bioorthogonales » (une réaction chimique qui peut avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs) pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Nous proposons de fonctionnaliser convenablement des nanoparticules afin de permettre leur modification in vivo par une réaction chimique de type « click » qui conduira à leurs éliminations de l'organisme. Ce travail concernera trois types majeur de nanoparticules : (1) ultra-brillants organique (utilisés classiquement pour l'imagerie en biologie ou plateformes de transport des composés pharmacologiques) ; (2) des nanoparticules d'or (faibles toxicités ; l'imagerie chez l'animal vivant); (3) des nanoparticules d'oxyde de fer (diagnostique médical). La possibilité d'éliminer de l'organisme ces différents types de nanoparticules (avec des caractéristiques et des profils de biodistribution différents) permettrait d'évaluer le caractère robuste de la stratégie

Les réactions dites « bioorthogonales » sont des réactions chimiques qui peuvent avoir lieu dans un milieu biologique complexe sans interférer avec les processus biochimiques natifs. Nous proposons de profiter du caractère non-invasif et inerte de ces réactions pour cibler et éliminer des nanoparticules chez l'animal vivant. Le contrôle de la biodisponibilité des nanoparticules peut être important pour les applications futures des nanoparticules in vivo.

Pour étudier la possibilité d'éliminer des nanoparticules de l'organisme d'un être vivant, il est indispensable d'utiliser comme modèle un animal dans son ensemble et sa complexité. Le remplacement par des modèles alternatifs n'est pas possible.

Pour réduire le nombre d'animaux dans les analyses pilotes, nous allons utiliser des souris C57BL6Ncr1 non-modifiées génétiquement et provenant des analyses de la reproduction dans les pièces d'hébergement d'animalerie et destinées au sacrifice. La taille des groupes expérimentaux sera fixée à n=6 animaux/traitement (taille validée pour les autres analyses biochimiques ainsi que pour les études pharmacocinétiques) et pourra être réduit en fonction de la variabilité biologique observée.

Dans le cadre de raffinement, la toxicité des nanoparticules sera préalablement testée in vitro. Les nanoparticules seront administrées par injections intra-péritonéales. Afin d'éviter les souffrances,

l'état de l'animal sera suivi après administration des composés. L'identification de symptômes de détresse entraînera la réduction de la durée du test ou l'élimination des nanoparticules concernées des tests. Les techniques standards de prélèvements permettront d'obtenir des échantillons sanguins et les tissus. Certains animaux seront perfusés au PFA en intracardiaque sous anesthésie à la xylazine/kétamine sans réveil. Au total, 251 animaux seront utilisés dans ce projet.

**8899** Le cancer basocellulaire (CBC) est le cancer le plus fréquent dans le monde. La chirurgie ou la radiothérapie sont généralement très efficaces. Même si les cas de CBC avancés ou métastatiques, qui ne peuvent plus être traités par chirurgie ou radiothérapie, sont peu fréquents, ils sont associés à une mortalité importante. De nouveaux agents thérapeutiques ont récemment été produits notamment le Vismodegib. Malgré son efficacité, il induit des effets indésirables conduisant fréquemment à la suspension ou l'arrêt du traitement. La dose de médicament généralement prescrite peut-être optimisée pour réduire ses effets indésirables. Cependant nous connaissons encore mal aujourd'hui tous les effets indésirables du Vismodegib et nous manquons de modèles expérimentaux animaux de CBC humains chez les animaux.

L'objectif de notre projet est d'identifier une dose de Vismodegib qui soit efficace avec des effets secondaires réduits.

En raison de la complexité des acteurs cellulaires et moléculaires, l'approche in vitro est très imparfaite et ne prend pas en compte les problèmes de biodisponibilité du médicament. Il est donc indispensable d'utiliser un modèle expérimental in vivo. La souris est l'animal le plus petit des mammifères permettant une telle étude.

Pour étudier le Vismodegib chez la souris nous avons besoin 1) de développer un modèle expérimental d'administration orale de Vismodegib qui mime les concentrations sanguines de Vismodegib des patients traités; 2) de développer un modèle expérimental de CBC chez la souris qui permette d'étudier l'efficacité anti-tumorale des doses de Vismodegib à tester; 3) d'identifier les effets indésirables en particulier neurovasculaires induits par le Vismodegib.

Pour l'étude de la concentration plasmatique du médicament, nous mettrons en place des modèles chez la souris (C57BL/6J) d'administration par gavage ou dans l'eau de boisson et prélèverons le sang pour le dosage du médicament par spectroscopie de masse.

Pour l'étude de l'efficacité de la dose, nous souhaitons greffer des cellules de patients atteints de CBC à des souris dans le but de créer un modèle animal de cette pathologie, qui est encore très rare aujourd'hui. Dans le but de contourner le problème du faible taux de prise de greffes obtenu jusqu'à présent dans la littérature sur ce type de pathologie, une biopsie cutanée de CBC sera directement implantée en sous cutané dans des souris immunodéficientes (NOD-Scid IL2Rgnull, NSG).

L'étude des effets neuronaux sera réalisée par électromyographie et histologie et les effets vasculaires par mesure de la pression artérielle et de la perméabilité des vaisseaux.

Ce projet durera 5 ans et requerra 476 souris. Pour suivre la règle des 3R, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte en limitant le nombre de souris par groupe au minimum requis pour avoir une signification statistique des résultats. Le raffinement est pris en compte dans la manière dont les expériences seront menées et à travers les conditions d'élevage. En particulier les souris seront hébergées par groupe de 5 dans des cages ventilées. La litière en cellulose se débobine pour pouvoir créer des nids si les souris en ont le besoin. Les animaux sont surveillés quotidiennement. Les expériences nécessitant des injections ou prélèvements seront effectuées sous anesthésie générale. Les expériences de greffe de tumeurs seront arrêtées bien avant la taille de tumeur (1000 mm<sup>3</sup>) qui suivrait les règles généralement utilisées comme pour les points limites (10% du poids de la souris soit >2000 mm<sup>3</sup>).

**8900** L'origine et la progression du cancer requièrent un ensemble de modifications de la cellule. Parmi ces modifications, une mutation qualifiée de « pilote » est l'évènement à l'origine, et soutenant la croissance des cellules tumorales. A ce jour, les mutations pilotes entraînant 45% des adénocarcinomes pulmonaires humains sont inconnues, ce qui complique le développement de traitements spécifiques. L'objectif de ce projet est donc d'identifier et de valider de nouvelles mutations oncogéniques pilotes à l'origine des adénocarcinomes pulmonaires.

Ces dernières années, l'avènement des technologies à haut débit a fourni des données de séquençage de tumeurs, y compris de celles d'un grand nombre de patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire. Ces données de séquençage ont montré que cet adénocarcinome est un des trois cancers présentant la plus haute fréquence de mutations. Cette fréquence élevée, associée à une connaissance limitée de la biologie de ces tumeurs, explique la difficulté à identifier l'évènement oncogène pilote chez presque la moitié des patients. Une meilleure connaissance des réseaux moléculaires impliqués dans l'initiation et le développement de l'adénocarcinome pulmonaire permettra une meilleure compréhension de ces tumeurs et ainsi la conception de thérapies ciblées plus efficaces.

Un obstacle majeur à la compréhension de la biologie des tumeurs est l'incapacité à observer en temps réel l'initiation et le développement de la malignité. Nous avons développé un modèle de micro-tissu 3D in vitro permettant d'identifier des mutations précoces entraînant potentiellement une initiation tumorale. Ceci nous permet d'exclure l'utilisation d'animaux pour la phase d'identification de mutations pilotes potentielles. Cependant, à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de récapituler fidèlement le tissu vivant et l'utilisation d'animaux de laboratoire (souris) reste nécessaire pour valider ces mutations in vivo. La procédure permettant l'induction des mutations identifiées spécifiquement dans les poumons des souris est déjà couramment utilisée et optimisée ce qui aura pour avantage d'utiliser un nombre réduit d'animaux pour chaque expérience.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 330 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos études dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Ce suivi des animaux sera réalisé en étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et l'équipe de recherche pour pouvoir agir rapidement et ainsi éviter tout inconfort ou souffrance des animaux. Enfin, les animaux seront hébergés par fratrie et à raison de 5 souris par cage. De plus, chaque cage sera dotée d'un enrichissement du milieu, comme des nids, afin de réduire le stress des animaux.

**8901** *Escherichia coli* est une espèce à la fois commensale du tube digestif et pathogène versatile responsable à la fois de pathologies intestinales et de pathologies extra-intestinales. Les souches pathologies extra-intestinales sont responsables de près d'1 million de morts par an. Certaines souches sont particulièrement efficaces pour ce type d'infection. Il se trouve que le portage de ces souches au niveau commensal augmente fortement dans les pays occidentaux ce qui suggère que les facteurs de virulence nécessaire aux infections ont certainement un rôle primordiale dans la colonisation du tube digestif. Il est donc capital de comprendre les déterminants de l'adaptation d'*E. coli* au tube digestif.

Pour comprendre l'adaptation des bactéries et notamment d'*E. coli*, l'évolution expérimentale a été utilisée au cours des 40 dernières années. Ces études ont permis de définir les grandes lignes du processus d'adaptation in vitro : Adaptation initiale rapide, puis déclin du taux d'adaptation, implications de régulateurs globaux dans les premières phases adaptatives... Cependant l'environnement naturel d'*E. coli* n'est pas le tube à essai mais plutôt le tube digestif des vertébrés où elle se retrouve une espèce minoritaire entourée de centaines d'autres espèces. Pour comprendre les pressions de sélection imposées par cette environnement et notamment par la flore digestive sur l'adaptation de *E. coli* et les comparer à celles observées in vitro, nous avons choisi de faire s'adapter une souche de *E. coli* au tube digestif de la souris.

Pour étudier l'adaptation au tube digestif d'*E. coli*, il est nécessaire d'avoir recours à un modèle animal. Le modèle de colonisation du tube digestif de la souris, traitée à la streptomycine, par la souche *E. coli* 536 est un protocole indolore particulièrement adapté et déjà pratiqué au laboratoire. Deux types d'expériences seront réalisés, des expériences d'évolution de longue durée, dans lesquelles deux souris seront inoculées par gavage et maintenues conjointement en cage pendant 1 an (200 souris sur 3 ans) et des expériences qui utiliseront le même protocole mais dureront entre 7 et 30 jours (100 à 200 souris sur 5 ans).

Le projet expérimental est conforme aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement (« règle des 3 R »). En effet :

Réduction. Pour l'expérimentation longue durée, le but est de comparer deux régimes alimentaires. Le grand nombre de répliques sur un protocole indolore et de longue durée (1 an) permet, par l'analyse des séquences des génomes et la comparaison des mutations apparues entre les répliques, d'identifier et de valider statistiquement la contribution des mutations à l'adaptation. Cette puissance statistique évite donc des expérimentations animales non concluantes. Les expériences sur temps court sont nécessaires pour valider expérimentalement les mutations identifiées dans l'expérimentation longue durée. Ce type d'expérience utilise des compétitions entre souches bactériennes afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement. Le raffinement est obtenu grâce au respect d'un délai d'au moins 48-72h entre l'arrivée des souris au laboratoire et le début de l'expérimentation animale, le respect des conditions optimales d'hébergement des souris (2 à 5 souris par cage), le caractère absolument indolore de l'expérience. De plus, le geste de gavage des souris a été réalisé par un membre du personnel expérimenté, pour la suite de l'expérimentation, aucun geste douloureux ou angoissant (de type geste de gavage) ne leur est infligé au cours de l'expérimentation, hormis des prélèvements de leurs fèces.

Remplacement. La complexité du microbiote intestinal avec plus de 500 espèces bactériennes, dont de nombreuses sont non cultivables, rend pour l'instant le remplacement de ce modèle expérimental par des modèles in vitro ou in silico non réalisable.

**8902** Les nerfs périphériques, permettant la conduction du message nerveux entre le cerveau et la périphérie, sont vascularisés par des vaisseaux sanguins permettant l'apport en oxygène et en nutriments indispensables. Ce système vasculaire, dit intra-nerveux, est donc nécessaire au bon fonctionnement du nerf. La neuropathie périphérique est un effet secondaire majeur développé par des patients traités par des agents pharmacologiques anti-cancéreux, comme notamment la molécule appelée oxaliplatine. Cette pathologie, caractérisée par une mort de certains nerfs périphériques, provoque des douleurs, une hypersensibilité au froid notamment au niveau des pieds, des mains et du visage. Cette neuropathie affecte donc sérieusement la qualité de vie du patient et à l'état avancé, la dégénérescence du nerf est telle qu'elle peut même parfois amener à une amputation du membre atteint. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement préventif ou curatif de cette pathologie. Il y a donc un besoin important de mieux comprendre le développement de cette pathologie afin de pouvoir proposer de nouvelles thérapies.

Ce projet vise à mieux comprendre le développement de cette pathologie et notamment l'implication du système vasculaire intra-nerveux. Pour ce faire, nous devons donc mesurer par tests comportementaux les critères de la pathologie afin de les associer aux conséquences observées sur le système vasculaire intra-nerveux étudiées post-mortem.

L'animal modèle utilisé afin de pouvoir étudier cette pathologie est la souris. Le nombre d'animaux total requis pour ce projet est de 160 animaux. Ce projet respecte les principes énoncés par les règles des 3R :

Remplacement : Ce projet modélisant la pathologie humaine et nécessitant la mesure de différents paramètres comportementaux et physiologiques, il n'est pas possible dans ce cas de s'affranchir de l'expérimentation animale.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide ; chaque animal peut être utilisé pour plusieurs procédures ce qui permet de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : les souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin d'assurer au mieux le bien être de l'animal en réduisant au minimum leur stress lors des manipulations ; Nous avons déterminé des critères d'arrêt précoce pour lesquels les animaux seront pris en charge par l'administration de médication et la sortie des procédures.

**8903** L'excès de masse grasseuse est une caractéristique de l'obésité et aussi un facteur de risque pour le développement de maladies chroniques. Le traitement permanent de l'obésité est délicat car il est difficile de maintenir la perte de poids. Des traitements pour stabiliser la perte de poids sont nécessaires. Les cellules adipeuses (adipocytes) sont des régulateurs clés du poids corporel et sont une cible potentielle pour les traitements permettant cette stabilisation pondérale. Après la perte de

poids, il y a des changements dans la capacité des adipocytes à stocker et à libérer de l'énergie, qui favorisent la reprise de poids. Les polyphénols sont des composés que l'on retrouve notamment dans les fruits et les légumes. Au cours de ces dernières années, ces polyphénols ont reçu beaucoup d'attention de la communauté scientifique et du public pour leur action sur les adipocytes. Des études cellulaires ont en effet montrés des effets sur la capacité des adipocytes à stocker et à libérer de l'énergie. Dans le cadre d'un projet d'étude visant à comprendre l'effet des polyphénols sur le métabolisme et la fonction des adipocytes, nous souhaitons tout d'abord examiner un point qui n'a pas encore été relevé dans la littérature : l'accumulation d'un polyphénol dans le tissu adipeux des souris. Les informations obtenues sur l'accumulation permettront la mise en place d'études visant à mieux comprendre le rôle des polyphénols dans la stabilisation du poids.

Remplacement : Notre projet de recherche nécessite l'utilisation d'un modèle animal, car à ce jour il n'est pas possible de réaliser ce type d'étude dans une simulation informatique ou par une expérience cellulaire. Un organisme vivant est nécessaire pour étudier le métabolisme des polyphénols qui est coordonné par plusieurs organes. La souris est un modèle de choix car son élevage est simple et son métabolisme est proche de l'humain.

Réduction : 24 souris seront utilisées dans cette expérience. Ce nombre de souris sera nécessaire pour obtenir une réponse statistiquement significative tout en minimisant l'utilisation des souris.

Raffinement : L'intervention principale de cette expérience sera le gavage de polyphénol. Le gavage n'induit pas de douleur mais il est brièvement inconfortable. Pour minimiser de potentiels risques les expérimentateurs vont surveiller les souris après l'administration. Si les expérimentateurs remarquent une détresse chez la souris, l'animal sera euthanasié de manière éthique.

**8904** L'objectif de ce projet est d'évaluer la fréquence et l'impact du transfert de gènes entre les espèces bactériennes qui composent le microbiote intestinal de souris. Cet objectif est d'autant plus important que de nombreuses études récentes ont révélé l'importance des microbiotes pour la santé de l'hôte auquel ils sont associés. On sait aujourd'hui que le microbiote intestinal joue un rôle central dans les mécanismes d'immunité, de susceptibilité aux infections ou même dans certains cancers. Toutes modifications de la composition de ces communautés (dysbiose) perturbent l'équilibre des interactions établies entre le microbiote et son hôte et peuvent se traduire par des effets physiologiques néfastes. Dans ce contexte, il apparaît important d'étudier les mécanismes de transfert de gènes et leur impact au sein du microbiote intestinal en utilisant des systèmes expérimentaux in vivo. En effet, les modèles de culture in vitro de lignées cellulaires ne permettent pas de modéliser les interactions à l'échelle d'un corps (microbiote, cellules immunitaires, fibroblastes, vaisseaux...). Le recours à des modèles précliniques in vivo est donc indispensable pour mieux comprendre le microbiote intestinal.

Le transfert de gènes participe à l'évolution rapide des génomes bactériens en facilitant la dissémination de capacités métaboliques pouvant conférer des avantages sélectifs à la souche receveuse. L'exemple le plus important est la propagation de résistances aux antimicrobiens, laquelle est un problème majeur de santé publique et une priorité d'étude pour la recherche scientifique. Les mécanismes moléculaires du transfert horizontal de gènes ont été largement étudiés par des approches génétiques et biochimiques, en revanche très peu d'études se sont intéressées au transfert au sein de communautés bactériennes naturelles. Ainsi, la fréquence des événements de conjugaison ainsi que leur impact sur la dynamique génétique des populations bactériennes restent à étudier. C'est le premier objectif de notre étude qui permettra de prendre la mesure de la fréquence du transfert de gène associé à différents éléments conjuguatifs transférables. Le deuxième objectif du projet est d'utiliser la conjugaison pour modifier la composition du microbiote intestinal de manière dirigée. Pour ce faire, nous allons utiliser la conjugaison bactérienne pour transférer des plasmides portant des gènes toxiques ayant une activité antimicrobienne sur souches receveuse ciblées.

Ces deux objectifs seront atteints à travers deux procédures expérimentales distinctes. La première procédure est basée sur l'étude du transfert d'un 'monitoring-plasmide' portant un gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente (iRFP670). Le suivi de la dissémination de ce plasmide au sein du microbiote intestinal sera réalisé par tomographie de souris endormies. La deuxième procédure est basée sur l'étude du transfert d'un 'recipient-killing plasmid' portant les gènes toxiques. L'impact du transfert de ce plasmide dans la population sera mesuré par séquençage du microbiote à partir



d'ADN extrait de fèces de souris. Chacune de ces deux procédures sera réalisées sur des souris avec microbiote naturel, ou avec microbiote simplifié (par prétraitement antibiotiques).

Le plan expérimental proposé permet de réduire le nombre de souris utilisées, tout en disposant d'un nombre suffisant d'individus pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera réduit à son minimum, sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Une observation des animaux, quotidiennement au début de l'expérience, puis a minima une fois par semaine pour un contrôle rigoureux des points limites sera réalisée. L'administration d'analgésiques, anesthésiques ou l'euthanasie seront envisagés si les situations observées les requièrent.

Ce projet inclura au total 468 souris.

**8905** La tuberculose (TB) est déclarée urgence de santé mondiale et une infection des plus meurtrière au monde. Environ 9 millions de personnes par an déclarent la maladie et 1,5 million en meurent. La TB recouvre un large spectre de formes cliniques et subcliniques. Aussi on estime qu'un tiers de la population mondiale est atteint d'une forme latente, qui représente un important réservoir invisible de la maladie. La distinction entre rémission spontanée ou post-thérapeutique et TB latente est également difficile et les tests diagnostiques standard permettent seulement une évaluation indirecte de la réactivité de l'hôte à *M. tuberculosis*, sans apporter aucune information sur le stade de l'infection ni le risque de réactivation. De fait, l'identification de marqueurs biologiques permettant le diagnostic rapide des infections latentes et l'anticipation de leur progression est un besoin urgent. Les tissus pulmonaires infectés présentent des lésions pathologiques bien distinctes les unes des autres, pouvant progresser indépendamment à des stades différents. Cette diversité des motifs infectieux, pour un même patient, conforte l'hypothèse que l'hôte comme le pathogène contribuent à ces variations. L'hétérogénéité phénotypique des mycobactéries augmente systématiquement dans un contexte infectieux comparé à des conditions de culture plus uniforme. Cette hétérogénéité phénotypique, aussi appelée ici diversité, peut permettre à la bactérie de faire face à des conditions environnementales stressantes et/ou être une stratégie efficace d'adaptation afin d'augmenter les chances de succès. Nous pensons que cette diversité bactérienne contribue à la survie sur le long terme du bacille dans l'hôte. Notre groupe s'efforce de comprendre les bases moléculaires de cette hétérogénéité phénotypique et son rôle dans la pathogénèse de la TB et sa progression. Dans ce but, nos recherches se concentrent principalement sur la physiologie bactérienne à l'échelon individuel et au sein d'une cellule eucaryote infectée unique. Dans ce cadre, afin de mieux comprendre le phénomène de la diversité bactérienne dans le contexte d'une infection, le modèle murin sera indispensable, en toute fin d'étude, en raison du haut niveau de complexité récapitulée exclusivement dans l'hôte.

Nous envisageons d'étudier l'influence de l'hétérogénéité phénotypique dans la géographie des lésions en utilisant des souches modifiées fluorescentes, inoculée par aérosolisation afin de mimer l'infection naturelle.

Les souris infectées par la souche pathogène (P3) *M. tuberculosis* développent la phase aiguë de la maladie dans les 2 semaines suivant l'inoculation. Le bacille se réplique dans le poumon mais atteint également d'autres organes comme la rate. Les souris développent alors une phase chronique et contrôlent la prolifération bactérienne à un niveau constant. Généralement, la phase chronique persiste toute la vie de l'animal. Cependant des facteurs d'immunodépression tel que l'âge ou la comorbidité peuvent entraîner la réactivation de la phase aiguë, à l'image de ce qui est décrit chez l'humain. Le modèle murin est donc bien adapté à l'étude la dynamique de l'infection.

En respect du principe des « 3Rs », nous remplacerons la majorité des animaux, par l'utilisation de lignées cellulaires et de systèmes de pointes tels que les approches microfluidiques mimant le microenvironnement de l'hôte. Seule les souches fluorescentes parfaitement caractérisées, marqueur des fonctions cellulaires ciblées et informatives seront utilisées pour les tests in vivo. Pendant la phase d'expérimentation animale qui sera finalement irremplaçable nous réduirons le nombre des animaux, ajusté au minimum requis pour réaliser des tests statistiques significatifs. Nous allons utiliser les animaux suivants au cours des 5 prochaines années, dans des procédures de classe de gravité modérée. Nous utiliserons en tout 312 souris femelles C57BL/6J et dérivés fluorescents

de (6-8 semaines). Nous affinerons nos méthodes, suivant la Directive 2010/63/EU pour la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les animaux infectés seront surveillés quotidiennement pour détecter les premiers signes possibles de souffrance et afin d'appliquer, si/quant nécessaire, le points limites humains.

D'un côté, nous effectuerons le suivi de bacilles marqués par des protéines fluorescentes dans le proche infrarouge (PIR) grâce à une technique d'imagerie non invasive du petit animal in vivo (IVIS) utilisant 60 animaux. Nous envisageons d'étudier la dynamique de l'infection par mycobactéries, pour mieux comprendre les mécanismes de contrôle versus ceux de la réactivation. Bien que nous ne soyons pas en mesure de visualiser les bacilles individuellement in vivo en raison de la résolution insuffisante de la technique, cette approche est beaucoup moins invasive et permet le suivi du même animal tout le long du processus infectieux (32 semaines). Notre but final est l'enregistrement de la progression de la maladie avec une résolution spatiotemporelle et l'identification de nouveaux réservoirs de bacilles en latence, dans des zones du corps encore non décrites. D'un autre côté, nous allons euthanasié 252 animaux pour effectuer des coupes de tissus pulmonaires et autres tissus afin de quantifier le nombre et la viabilité de bactéries par formation de colonies sur milieu solide et pour effectuer la microscopie en accéléré. Dans l'ensemble, cette approche nous permettra de suivre la physiologie et la diversité de bacilles tout au long de l'infection et pourrait nous permettre d'identifier des facteurs impliqués dans la dynamique de l'infection, la survie du pathogène et de mettre en évidence des marqueurs biologiques.

#### **8906 RESUME NON TECHNIQUE :**

Nos fonctions sensorielles, motrices s'appuient sur la communication entre le cerveau et la moelle épinière. À la suite d'une atteinte traumatique de la moelle épinière, ces fonctions sont donc durablement affectées en dessous de la lésion. L'objectif principal des travaux de la présente saisine vise à étudier la récupération locomotrice et la "plasticité" des réseaux locomoteurs spinaux localisés sous une lésion chez le rat, modèle expérimental exprimant une physiopathologie proche de l'homme. Nous visons sur le long terme à identifier les facteurs clés qui permettent une récupération locomotrice chez des animaux lésés à la naissance et qui font défaut dans un contexte de non récupération lorsque la lésion survient plus tardivement au cours du développement. Identifier des facteurs clés intervenant dans la récupération locomotrice après une lésion néonatale pourrait s'avérer précieux pour la conception d'approches thérapeutiques objectives applicables chez l'adulte. Notre démarche se veut originale et objective dans un contexte où l'ensemble des travaux menés dans le domaine s'appuie uniquement sur la comparaison d'animaux lésés et non lésés, approche qui ne permet pas de prendre en compte le caractère irréversible des changements post-lésionnels dans la conception de stratégies thérapeutiques.

Le présent projet est bâti autour de 2 objectifs principaux que nous souhaitons atteindre au cours des 4 années à venir. Le premier consiste à documenter l'impact du stade développemental au moment de la survenu d'une lésion spinale sur la récupération locomotrice et les remaniements anatomiques, chimiques et moléculaires qui se mettent en place au niveau du tissu nerveux. Le deuxième objectif consistera en parallèle à élucider le mécanisme d'action qui sous-tend l'action pro-locomotrice connue d'un acide aminé (la L-Dopa) à la suite d'une lésion de la moelle épinière chez l'animal.

Le choix de la mise en place du projet au laboratoire à cet instant est le fruit d'un travail préparatoire qui a consisté à réunir l'ensemble des moyens matériels (chirurgicaux, tests comportementaux etc.) et l'expertise nécessaire à sa réalisation. En regard de l'absence d'outils non invasifs permettant chez l'homme l'exploration des phénomènes physiopathologiques que nous souhaitons étudier, et du manque de connaissances nécessaires à l'établissement d'outils de modélisation des phénomènes traumatiques centraux, notre projet ne peut s'abstenir de l'utilisation du modèle animal. Le choix du rat est objectivé par ses capacités de récupération post-traumatique proche de l'homme. Au cours des cinq années, nous utiliserons au maximum 418 rats, chaque groupe expérimental (sham, lésé) étant constitué de 6 à 20 animaux, chiffres qui prennent en compte les contraintes statistiques et la nature des expériences/analyses réalisées. Chaque expérience sera lancée dans un premier temps sur un nombre restreint d'animaux afin d'évaluer la pertinence de poursuivre la série expérimentale. Par ailleurs, dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux dans les projets à venir, nous enrichirons une banque de tissu à partir des animaux utilisés dans ce projet.

Le projet respecte les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le projet requiert l'utilisation de 418 rats qui seront suivis d'un point de vue comportemental dans le temps. Le modèle rat a été choisi en raison de sa pertinence par rapport à la physiopathologie humaine et les méthodologies ont été sélectionnées en accord avec une pratique expérimentale respectueuse du bien-être des animaux. Nous sommes particulièrement vigilants en ce qui a trait au bien être animal et la prise en charge de la douleur. Des points limites précoces et spécifiques de notre étude ont été fixés et des procédures adaptées ont été établies, les mesures analgésiques incluses dans protocoles permettant de garantir à la fois la pertinence des résultats et le bien-être des animaux. Les chercheurs participant au projet ont une solide expérience dans la manipulation de rongeurs et l'ensemble des compétences requises à sa réalisation (notamment chirurgicales). À ce titre, il convient de préciser d'une part que le chercheur par ailleurs référant en matière de bien être animal au laboratoire prend part au présent projet et d'autre part que le projet est bâti en accord avec les recommandations et conseils de la vétérinaire de l'établissement. Cette dernière sera sollicitée chaque fois que nécessaire par le coordinateur du projet qui lui permettra en outre de suivre, bien que de façon externe, le déroulement du projet et de proposer des procédures de raffinement bénéfiques à tous les égards.

**8907** Le diabète de type 1 est un problème de santé publique majeur, son incidence ne cesse d'augmenter dans les pays occidentaux. La prise en charge actuelle repose, dans la majorité des cas, sur l'administration pluriquotidienne d'insuline par stylos, en injection sous cutanée. Ce traitement, très contraignant, permet de rétablir un équilibre glycémique, mais s'accompagne d'une augmentation des hypoglycémies sévères pouvant menacer le pronostic vital. C'est pourquoi différentes approches, visant le rétablissement du fonctionnement des cellules bêta ont été développées, dont l'allogreffe d'îlots de Langerhans. Les techniques d'évaluation in vitro des cellules pancréatiques humaines souffrent d'un manque de corrélation avec la fonction des cellules greffées chez l'homme. Un modèle animal (souris) de greffe de cellules pancréatiques a été mis au point et montre une corrélation entre la fonction du greffon humain chez la souris (dosage d'hormone humaine) et la fonction obtenue chez le patient receveur de la même préparation cellulaire.

Le modèle utilisé est la souris immunodéficiente Nude, celles-ci seront greffées avec les cellules humaines au niveau de la capsule rénale.

Nous traitons environ 70 pancréas humains par an, nous transplanterons 2 souris par organe. 140 souris seront traitées chaque année soit 700 souris sur 5 ans.

Afin de respecter la règle des "3R", Réduire : seuls 2 animaux seront utilisés par pancréas, l'analyse se faisant sur l'ensemble des pancréas d'une année. Remplacer : Pas de technique in vitro performante permettant de se corréler avec les résultats des patients. Raffiner : Les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

**8908** Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) sont parmi les cancers du sang les plus courants. Les patients sont traités par des combinaisons de chimiothérapies, immunothérapies et/ou radiothérapies. Malgré une efficacité montrée dans 75% des cas, certains patients ne répondent pas bien voire pas du tout à ces traitements.

Il est donc primordial de mieux comprendre la maladie ainsi que de caractériser les mécanismes d'action des traitements proposés aux patients et ce, dans un modèle d'études adapté, tel que le modèle murin.

Ainsi, nous souhaitons développer 3 projets d'études portant au total sur 520 souris dépourvues de système immunitaire afin de :

- 1/ développer des tumeurs à partir de cellules issues de patients atteints de LNH
- 2/ visualiser au sein de la souris la localisation de certains médicaments
- 3/ étudier leurs efficacités

Ces trois axes ne peuvent être réalisés sur des cellules directement (in vitro) car elles ne miment pas la pathologie (Remplacement). Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum permettant tout de même d'avoir des résultats statistiquement exploitables (Réduire). Enfin, des observations quotidiennes des animaux permettront d'évaluer leur état de douleur, souffrance et angoisse. Le cas échéant, les animaux seront euthanasiés (Raffinement). La règle des 3R sera ainsi respectée. Ces études permettront donc de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement tumoral et d'évaluer l'efficacité de certaines molécules thérapeutiques.

**8909** La recherche sur la réparation osseuse suite à un traumatisme est en constante évolution. La recherche s'est longtemps orientée vers des implants non dégradables. Pour ce type d'implants, il est important de vérifier l'absence de toxicité mais aussi la bonne tolérance du matériau. Mais la recherche s'oriente aujourd'hui vers des implants biodégradables et potentiellement totalement résorbables par le corps, évitant ainsi une seconde opération pour retirer les implants après la fin de la reconstruction osseuse. Il est donc important, pour ce type d'implants d'évaluer l'ostéointégration dans le processus de réparation et le comportement de résorption au cours du temps, mais également de vérifier l'absence de toxicité.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution au cours du temps d'implants biodégradables ou non, insérés dans l'espace intramédullaire fémoral ou tibial chez le rat.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux (maximum 90 par étude) sera variable en fonction du nombre de produits à tester et/ou du nombre de zones d'injection (soit 10 études) pour un total de 900 rats.

Afin de répondre à cet objectif, 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 d'implants insérés dans le fémur ou dans le tibia d'un organisme entier vivant. En effet, ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que l'activité de l'animal, la zone de l'implantation, les tissus environnants, etc. Le modèle, réalisé chez le rat, est un modèle largement décrit dans la littérature. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'évolution des implants au cours du temps. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas d'euthanasie d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et s'inscrivent donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux.

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de points limites éthiques et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi de mettre en place les traitements adaptés le plus rapidement possible. Lors de chirurgies, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques pour empêcher une infection de la zone opérée, antalgique pour supprimer la douleur liée à la chirurgie,...)

Ce projet pourra permettre, in fine, de proposer sur le marché de nouveaux implants chirurgicaux pour la reconstruction osseuse.

**8910** Ce projet consiste à tester une nouvelle approche d'immunothérapie dans le contrôle du développement d'une tumeur mammaire chez la souris. Un maximum de 120 souris de souche C57Bl/6 sera utilisé afin d'établir la preuve de concept de l'utilisation d'un composé X sur l'inhibition du développement tumoral. Pour cela, des cellules de carcinome mammaire seront injectées directement dans la glande mammaire des souris et, après installation et développement de la tumeur, les souris seront traitées par injection du candidat X.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 120 souris dans le respect de la règle des 3R. L'approche par imagerie, développée ici, permet de réduire le nombre d'animaux et de limiter leur

souffrance. Cela implique que le projet soit effectué en plusieurs étapes et dans 2 établissements utilisateurs différents.

- Remplacement : Une approche in vitro a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Les souris sont anesthésiées à l'aide d'isoflurane pour l'implantation des cellules tumorales cependant tout type de médication pouvant interférer avec l'étude de la réponse immunitaire et/ou l'action du traitement X est proscrit.

**8911** L'enjeu majeur en ce jour de résistance aux antibiotiques, est de mieux comprendre l'interaction entre une bactérie pathogène et son hôte pour mieux combattre le processus infectieux. Nos études ont contribué à ouvrir un nouvel axe de recherche portant sur la reprogrammation génique de l'hôte par les bactéries pendant l'infection. Nous avons montré qu'une bactérie pathogène pouvait modifier des protéines de l'hôte nommées histones. Celles-ci sont responsables de l'organisation tridimensionnelle de la structure d'ADN et régulent l'expression des gènes. C'est dans ce contexte que nous étudions le pathogène opportuniste *Streptococcus pneumoniae*. Cette bactérie est la cause la plus commune de méningites bactériennes chez l'adulte et les infections invasives peuvent conduire à des pneumonies et/ou des otites. Sa transmission se fait de personne à personne et est aggravée du fait que *S. pneumoniae* est présent comme colonisateur naturel des voies respiratoires humaines. Les pathologies et les traitements sont compliqués par le fait qu'il existe plus de 90 sérotypes de cette bactérie. Les mécanismes qui permettent à la bactérie de persister dans le nasopharynx, de devenir invasive, et l'impact à long terme sur le système immunitaire ne sont pas bien étudiés. Nous nous intéressons donc à l'étude de l'impact de cette bactérie sur les cellules hôtes telles que les cellules immunitaires. En particulier, nous étudierons les cellules « natural killer » (NK) qui sont bien connues pour leur rôle anti-cancéreux mais dont le rôle au cours d'une infection ou d'une inflammation n'est pas suffisamment exploré. Les cellules NK sont présentes dans la moelle osseuse, la rate, le sang, mais aussi dans des compartiments comme les poumons ou la cavité péritonéale.

En parallèle d'études in vitro, nous aurons recours à un modèle animal car l'analyse des cellules immunitaires ne peut se révéler fructueuse que si ces cellules viennent directement de l'animal et pas de lignées cellulaires établies. De plus, il n'existe pas de lignées de cellules NK satisfaisantes. L'usage de la souris permet d'aborder l'étude de cellules dérivant de compartiments différents, alors que l'analyse chez l'homme se limite généralement aux cellules du sang. L'usage d'un modèle animal nous permet également d'analyser les modifications des caractéristiques des cellules immunitaires lors de processus infectieux sur plusieurs semaines.

Les souris seront élevées et manipulées dans le respect des conditions réglementaires. Ce projet entraînera des effets néfastes pour les animaux occasionnés par les infections induites. Une perte de poids et malaise sont à attendre. Un suivi quotidien des animaux infectés sera fait. Dans le cas où des manifestations cliniques pouvant indiquer une souffrance (prostration, apathie, perte de poids supérieur à 20%) sont observées, les individus concernés seront euthanasiés immédiatement. Les souris qui présenteraient des signes de douleur ainsi que les animaux en fin d'expérience seront euthanasiés selon les procédures validées en expérimentation animale.

Pour ces études, nous utiliserons comme modèle des souris consanguines ainsi que des souris génétiquement modifiées de sexe femelle et âgées entre 7 et 10 semaines. Le nombre de souris sera minimisé en utilisant des systèmes de bioluminescence et en prélevant le maximum d'organes par animal euthanasié. Le projet se compose de 4 procédures qui seront modérées ou sévères. Nous prévoyons d'utiliser 802 souris sur 5 ans.

Le bénéfice attendu du projet sera une meilleure compréhension du système immunitaire en réponse aux bactéries pouvant aboutir à des traitements antibactériens mais aussi à des traitements de maladies impliquant une dérégulation du système immunitaire (sepsis, autoimmunité, etc.).

**8912** La ménopause est définie comme la cessation permanente des menstruations et de l'ovulation en raison de l'insuffisance ovarienne. La baisse des taux d'œstrogène et de progestérone chez la femme peut alors conduire à un certain nombre de symptômes gênants : bouffées de chaleur, sueurs nocturnes, troubles de l'humeur, insomnies et atrophie vulvo-vaginale (AVV). Les troubles génito-urinaires de la ménopause incluent l'AVV et les symptômes du bas appareil urinaire. Environ 50 à 60% des femmes ménopausées peuvent présenter ces symptômes uro-génitaux avec un retentissement significatif sur la qualité de vie.

Le bénéfice clinique d'une oestrogénothérapie (thérapie basée sur l'emploi d'œstrogène) substitutive est démontré. Cependant, la morbidité cardio-vasculaire de l'oestrogénothérapie par voie générale n'est pas négligeable et contre indique certaines patientes à ce type de traitement. C'est pourquoi un nouvel œstrogène/SERM est en cours de développement pré-clinique pour le traitement hormonal substitutif de la ménopause.

L'intérêt de cette molécule est d'avoir des effets hépatiques limités, et donc de ne pas induire les facteurs de la coagulation, permettant d'espérer un moindre risque thrombo-embolique par rapport aux estrogènes classiquement utilisés.

L'effet de cet SERM sur la trophicité vaginale chez la souris ovariectomisée a été démontré mais son effet sur le bas appareil urinaire n'a jamais été évalué.

Par ailleurs, cette molécule est actuellement en développement clinique pour la contraception orale (phase 3 d'efficacité en Belgique).

L'objectif de l'étude est d'en évaluer les effets fonctionnels et morphologiques sur le bas appareil urinaire chez la souris ovariectomisée (modèle de ménopause) et de déterminer les mécanismes d'action moléculaire conduisant à ces effets.

Actuellement, les méthodes alternatives permettant une évaluation de la fonction vésicale, sont inexistantes. De ce fait, le recours à l'expérimentation animale reste incontournable.

Le choix de l'espèce est lié à la disponibilité des modèles de souris transgéniques d'inactivation du récepteur aux œstrogènes et ses différents sous-types.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit auprès des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 296 souris en raison de 8 souris incluses par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

**8913** Le stress chronique constitue une des atteintes les plus sévères et délétères à la santé d'un individu et les recherches récentes décrivent les substrats biologiques de cette sensibilité ainsi que les populations à risques. Ces dernières sont les enfants et les personnes âgées. Pour les premiers, la raison est que la réactivité des circuits centraux et hormonaux du stress est déterminée pendant le développement embryonnaires et certaines phases critiques lors de la jeunesse (petite enfance et adolescence). Pour les seconds cela repose sur le fait que le vieillissement entraîne une diminution des capacités de résistance au stress.

Nos modes de vies occidentaux entraînent un cercle vicieux avec une augmentation du stress général associé à un vieillissement de la population. C'est pourquoi il est urgent d'approfondir notre connaissance des mécanismes du stress pour être à même de mettre au point des solutions cliniques et sociétales à ces problèmes.

Notre effort dans ce sens s'articule autour des deux projets suivants :

1/ De caractériser les répercussions fonctionnelles des changements de flore intestinale associées au vieillissement. En effet, de nombreuses études ont décrit ces changements mais leurs répercussions fonctionnelles sont jusqu'à présent inconnues et seront testées en procédant à un échange de flore intestinale entre animaux jeunes et âgés. Les répercussions fonctionnelles sur les capacités mnésiques, le niveau d'activité des circuits centraux du stress ainsi qu'à la capacité de

résister à ce dernier seront testées chez la souris à l'aide de tests comportementaux listés et décrits plus loin.

2 / Etude des circuits centraux du stress et de la possibilité de moduler ces derniers par la périphérie et plus spécifiquement par le biais du nerf vague. Ce dernier constitue la voie de communication entre les intestins et le cerveau. La stimulation du nerf vague est en utilisée chez les patients dépressifs et a montré de bons résultats. Cette technique n'est pourtant pas démocratisée car son mode d'action est mal compris et est associé à des effets secondaires et d'infections associée à la nécessité d'implanter un stimulateur. Ma spécialisation, en synergie avec une des expertises du laboratoire, réside dans l'utilisation d'outils génétiques de manipulation de l'activité neuronale que nous voulons appliquer à la stimulation du nerf vague pour traiter les maladies psychiatriques liées au stress. Nous testerons d'abord cette approche dans des modèles murins de stress chroniques avec pour but d'étendre ces résultats à la clinique.

Il n'existe malheureusement pas à l'heure actuelle de méthode alternative à l'expérimentation animale pour étudier l'impact des changements de la flore bactérienne sur le cerveau ou les circuits centraux du stress. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 2550 souris dont des souris âgées ou soumises à du stress (vieillesse précoce). Des souris mâles et femelles seront utilisées pour prendre en compte les différences de sensibilité au stress et au vieillissement entre les deux sexes. Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour la réalisation des études statistiques ultérieures, qui permettront une évaluation pertinente de l'effet des différentes conditions expérimentales sur les atteintes liées au stress et au vieillissement.

Ce projet comporte 6 procédures expérimentales de niveau modéré ou sévère :

- Transfert de flore bactérienne entre souris jeunes et âgées pour étude des répercussions fonctionnelles du microbiote âgé sur le fonctionnement cérébral.
- Transfert de flore bactérienne entre homme et souris pour étude de l'effet du microbiote humain de personne âgé sur le fonctionnement cérébral.
- Chirurgie pour injection stéréotaxique de vecteurs viraux en intracérébral et stimulation optogénétique.
- Manipulation d'activité du nerf vague par injection stéréotaxique de vecteurs viraux dans le nodose du nerf vague.
- Chirurgie pour injection stéréotaxique de vecteurs viraux dans le système nerveux central et transfert de microbiote âgé pour tester le rôle de l'activation des circuits centraux du stress pour les effets négatifs du microbiote âgé sur le fonctionnement cérébral.
- Influence du stress sur la qualité du vieillissement

Tous les efforts techniques seront mis en place pour minimiser au maximum toute douleur et tout inconfort de l'animal.

Les bénéfices attendus du projet sont, i) de mieux appréhender les mécanismes sous-tendant le vieillissement et des pathologies psychiatriques comme la dépression et l'anxiété, ii) de mettre au point des traitements innovants comme la mise au point de probiotiques adaptés aux personnes âgées et pour permettre de mitiger les effets délétères du stress, ou de nouvelles techniques de stimulation du nerf vague pour permettre de traiter les malades souffrant de maladies psychiatriques liées au stress et résistant à toute forme de médication.

**8914** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, dont une majorité est due aux cardiopathies ischémiques. Malgré les progrès thérapeutiques réalisés, il est attendu que d'ici 2030, 23,6 millions de personnes décèdent d'une atteinte coronarienne. Comprendre les mécanismes des cardiopathies ischémiques représente donc un enjeu scientifique et médical majeur. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus afin d'explorer in fine de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans cette optique nous avons développé un modèle d'ischémie-reperfusion sur lapin, largement éprouvé dans la littérature, qui nous permet de réaliser des études sur la taille de l'infarctus, ainsi que des études fonctionnelles, biochimiques et biomoléculaires.

Nous avons identifié une structure appelée pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) au sein de la mitochondrie, centrale énergétique de la cellule cardiaque, comme cible thérapeutique pour réduire la taille d'infarctus (= cardioprotection). Cependant, les inhibiteurs du PTP actuels ne

sont pas satisfaisants en terme de cardioprotection. Ainsi, grâce à une collaboration avec un laboratoire de recherche américain spécialisé en chimie, notre objectif est de caractériser l'effet cardioprotecteur de 4 nouvelles molécules inhibitrices du PTP. Il s'agit ici de la première étape de recherche pré-clinique pour la mise en évidence de nouvelles pistes thérapeutique dans le traitement de l'infarctus.

Dans un premier temps, nous déterminerons la taille d'infarctus après injection de ces molécules dans notre modèle d'ischémie-reperfusion sur lapins. Dans un second temps, nous mesurerons l'impact de l'administration de ces molécules, pendant l'ischémie-reperfusion, sur plusieurs paramètres mitochondriaux habituellement impliqués dans les mécanismes de cardioprotection.

L'expérimentation portera donc sur notre modèle d'ischémie-reperfusion sur lapins (New Zealand White de 2,5 à 3,5kg) commandés chez un fournisseur agréé. Nous réaliserons deux protocoles au cours de cette étude qui nécessitera 128 animaux maximum au total.

REGLE DES 3R :

Réduction : Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. De plus, la deuxième partie de l'étude ne portera que sur les composés qui se seront révélés efficaces dans la première partie. Enfin, le prélèvement (puis conservation) d'autres tissus que le cœur est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements.

Raffinement : La chirurgie cardiaque envisagée dans ce projet est une chirurgie lourde, mais parfaitement maîtrisée au laboratoire. Elle est par ailleurs accompagnée par un protocole anesthésique et analgésique adapté, maintenu jusqu'au prélèvement cardiaque final effectué après une surdose létale d'anesthésique. Ainsi, l'expérimentation ne fera pas l'objet d'un réveil (à l'issue de la chirurgie), évitant toute complication, souffrance ou douleur post-opératoire.

Remplacement : Le projet s'appuie au maximum sur les données déjà existantes de la littérature et aucune expérience alternative (in vitro ou simulation informatique) ne permet à l'heure actuelle d'apporter une réponse satisfaisante (intégrée sur l'organisme complet) à la question posée.

**8915** La pathogénèse de la dermatite atopique (DA) est complexe et reste à ce jour mal comprise. Plusieurs évidences cliniques suggèrent aujourd'hui que l'évolution de la microflore cutanée au cours de la pathologie jouerait également un rôle important dans les récurrences, la chronicité et la sévérité de cette maladie. Il a été montré que la peau d'individus normaux est colonisée par une communauté microbienne très diverse, alors que les patients atteints de dermatite atopique présentent un déséquilibre avec une surreprésentation de souche de staphylocoques.

Les objectifs de cette étude viseront dans un premier temps à développer un modèle murin de DA induit par l'application topique de souches de *Staphylococcus aureus*/ *Staphylococcus epidermidis* isolés de la peau de patients DA sévères ou modérés (ainsi que chez des individus porteurs sains), dans un deuxième temps à mieux comprendre les mécanismes immunologiques associés et enfin à tester l'efficacité de molécules afin de bloquer l'inflammation cutanée induite par ces staphylocoques. Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 776 souris au maximum. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal, et en fonction des résultats obtenus, certaines expériences ne seront peut-être pas réalisées. Le bien être des animaux (raffinement) est également pris en compte, en effet, les animaux seront endormis par anesthésie générale lors des procédures afin de diminuer au maximum le stress et la douleur de ces derniers. De plus, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu. L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'in vivo et fait suite à un package d'études in vitro qui ont illustré l'activité anti inflammatoire de ces composés.(remplacement).

**8916** L'essai chez le malade cancéreux de traitements nouveaux demeure d'actualité et ce d'autant plus que la mise en place de chimiothérapies balancées adaptées à chaque patient est un schéma



thérapeutique de plus en plus fréquent. Ce type de stratégie nécessite une importante palette de molécules. Les molécules actives contre la croissance des tumeurs présentent une toxicité importante par rapport à d'autres classes thérapeutiques et, de ce fait, le screening de ces molécules sur des modèles mammifères porteurs de différents types de tumeurs, induites par la greffe de cellules tumorales humaines ou animales est une phase essentielle dans l'estimation de la balance bénéfique/risque des principes actifs nouveaux.

Le présent projet s'insère entre les phases de sélection in vitro de molécules ou de formulations actives sur des cultures cellulaires tumorales et les premiers essais sur le patient. La phase d'essai d'efficacité sur les petits mammifères présentée ici comporte typiquement trois étapes :

- évaluation de la dose maximale ne présentant pas de toxicité aiguë sur l'animal,
- pharmacocinétique du principe actif à cette dose maximale tolérée (DMT),
- efficacité d'un traitement de trois semaines adapté à la pharmacocinétique et à plusieurs doses inférieures à la DMT sur un ou plusieurs modèles de tumeurs induites chez la souris.

Nous utilisons soit des lignées cellulaires induisant des tumeurs issues de l'espèce de rongeur utilisée comme modèle de l'Homme, soit des lignées cellulaires tumorales d'origine humaine. Ce choix de lignées cellulaires détermine le type de lignée de rongeur qui devra être utilisée. En effet, pour accepter les greffes de cellules d'origine humaine, les animaux doivent être immunotolérants et des lignées de rongeurs présentant différents stades d'immunodéficience sont utilisées dans ce cas.

Le site d'implantation de la tumeur peut être sous cutané - et c'est encore aujourd'hui le modèle le plus classique et le plus utilisé pour les essais d'efficacité anti-tumorale de molécules nouvelles. A l'inverse, lorsque cela est possible, l'induction de tumeurs dans l'organe cible naturel des lignées cancéreuses utilisées est souvent plus pertinent pour l'évaluation de l'efficacité du produit testé car l'environnement tissulaire est un élément capital de l'agressivité des tumeurs et de leur résistance aux traitements. Selon le type de modèle, les animaux subissent une simple injection sous cutanée ou une intervention chirurgicale mineure permettant l'injection dans l'organe visé sous contrôle visuel. Les tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude ont été choisis de sorte qu'un nombre le plus réduit possible d'animaux soit utilisés pour l'interprétation des résultats (5 à 12 animaux par groupe en fonction du type de procédure), par ailleurs, la détermination de points limites précis (volume tumoral <2000mm<sup>3</sup>, perte de poids <20%,..) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux au maximum. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Pour nous permettre de réaliser chacune des procédures constituant ce projet pendant 5 années, le nombre total d'animaux nécessaire est de 6765 souris.

**8917** L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet du fractionnement de la radiothérapie (RT) (nombre de séances de rayons) délivrée par des photons sur la croissance tumorale, l'efficacité des mécanismes de réparations des dommages de l'ADN et enfin sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Ce projet sera réalisé en parallèle par des collaborateurs qui utiliseront de la RT par protons afin de comparer leurs résultats avec les nôtres dont la RT sera réalisée par photons.

Pour analyser l'efficacité du traitement, nous étudierons l'effet de deux schémas de RT, délivrés soit en une fraction unique, soit en trois fractions, sur la progression de tumeurs sous cutanées, en utilisant des cellules murines de cancer de colon (CT26).

La première partie de l'étude, évaluant l'efficacité des traitements en termes de retard de croissance tumorale, nécessitera 108 souris.

La seconde partie, évaluant l'effet des traitements sur les cassures de l'ADN et sur l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale à différents temps après RT, nécessitera 270 souris. Au total, 378 animaux seront nécessaires pour effectuer les expériences trois fois de manière indépendante, afin d'obtenir des résultats fiables.

Dans le respect du principe de réduction, l'évaluation de l'effet des traitements sur la croissance tumorale sera effectuée avec des souris réparties par groupes de 10 individus et pour l'analyse biologique à différents points de cinétique post-RT par groupes de 5 individus. Pour chaque expérience 20% d'animaux supplémentaires seront greffés afin de constituer des groupes de souris de volumes tumoraux comparables et homogènes. Ces répartitions prennent en compte la variabilité

de notre modèle, l'expérience d'études précédentes et permettront d'obtenir des données significatives avec une bonne puissance statistique comme décrit dans la littérature.

Les souris seront pesées et leurs tumeurs mesurées trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. Les souris seront euthanasiées par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse dès lors qu'un point limite sera atteint (Raffinement) (lorsque les tumeurs auront atteints 1500 mm<sup>3</sup>, ou perte de poids importante ou lors d'apparition de signes de souffrances ou lors de la persistance de plus de 48h d'une nécrose humide de la tumeur de plus de 5mm de diamètre). Les souris seront sous anesthésie gazeuse dès que des procédures douloureuses et/ou stressantes (injection des cellules tumorales et séances de RT) seront réalisées, toutefois aucune toxicité n'est attendue aux doses de RT utilisées. Lors de la seconde partie de l'étude les souris seront euthanasiées aux différents temps de cinétique et les prélèvements biologiques seront réalisés afin d'analyser les cassures de l'ADN et l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Enfin, seule une étude sur des modèles animaux permettra d'analyser l'effet des modalités d'administration de la RT sur la réponse immunitaire.

Les résultats finaux obtenus permettront de fixer le schéma d'administration de RT par photons ou par protons le plus efficace en terme d'effet direct sur la tumeur (nombre de cassures de l'ADN), mais aussi propice à l'association de la RT avec des immunothérapies qui sont actuellement évaluées dans de nombreux essais et dont les effets sont prometteurs.

**8918** Afin de comprendre les mécanismes associés à la capacité d'adaptation des femelles au système de maternité et leurs relations avec la survie et la croissance des jeunes pendant la lactation, nous souhaitons mettre en place un dispositif de phénotypage fin automatisé des aptitudes maternelles en unité expérimentale cunicole. Ce projet a pour but la mise au point d'outils pour mesurer les variations de poids de la portée et de la lapine ; le comportement maternel de la lapine (temps passé au nid) et le comportement de sortie de nid des lapereaux. L'objectif sera de mettre au point et rendre opérationnel ce dispositif d'enregistrements automatisés pour enregistrer des données individuelles de survie et croissance des lapereaux, variation de poids des lapines, et comportement animal.

Pour ce faire, nous devons marquer individuellement les lapereaux avec un implant sous-cutané. Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé à 126, répartis comme suit : 6 lapines + 6 lapines x 2 portées x 10 lapereaux par portée. Le projet se déroulera sur 5 ans.

Cette étude respecte la règle des 3R :

- Remplacement : L'étude de la croissance des lapereaux et du comportement maternel des lapines ne peut être réalisée que sur l'espèce concernée. Et l'identification individuelle des animaux par implant sous-cutané est la meilleure solution trouvée pour suivre les animaux facilement durant l'expérimentation.

- Réduction : Nous avons estimé que l'effectif de 126 animaux est un effectif minimum pour atteindre une puissance de dispositif suffisante pour la mise au point de l'outil.

- Raffinement : Les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage conventionnel. La procédure d'identification des lapins avec un implant sous cutané est rapide. Afin de limiter la douleur, une crème analgésique sera administrée pour rendre la zone d'injection indolore. La contention sera réalisée par du personnel formé et habitué. Les animaux seront surveillés après l'identification.

**8919** La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares. Dans la population caucasienne, la maladie représente environ une naissance sur 4500. Il s'agit d'une maladie mortelle qui touche principalement les poumons, le pancréas, l'intestin, les glandes sudoripares et qui s'exprime dès la petite enfance avec une prise en charge lourde et onéreuse. Les progrès importants dans la prise en charge des symptômes de la maladie et les possibilités de transplantations d'organes ont conduit à une augmentation importante de l'espérance de vie des patients.

Les modèles animaux ont largement participé à la connaissance de la pathologie. Les modèles souris expriment certaines caractéristiques de la pathologie, notamment des obstructions intestinales sévères, mais ils ne présentent pas de manifestations pulmonaires. Or c'est l'insuffisance pulmonaire chez l'humain qui est la principale cause de mortalité. En revanche des études précédentes ont montré que le rat pouvait représenter un modèle intéressant pour le phénotype respiratoire de la mucoviscidose.

Notre projet a pour but de caractériser un nouveau modèle de mucoviscidose chez le rat. A notre connaissance, il n'existe pas de modèles in vitro ou ex vivo permettant d'obtenir les informations obtenues avec ces procédures chez l'animal in vivo.

La mucoviscidose est une maladie génétique due aux mutations du gène cftr qui rendent la protéine inopérante. Des stratégies thérapeutiques spécifiques en fonction de la nature des mutations sont actuellement étudiées. Une lignée de rats porteurs de la mutation la plus fréquente chez l'homme a été développée grâce à une approche génétique reposant sur l'utilisation de nucléases spécifiques (CRISPR) permettant de réduire le nombre d'animaux.

L'objectif du projet est de caractériser les répercussions de la mutation en utilisant plusieurs tests in vivo pour détecter chez les animaux porteurs de la mutation des anomalies au niveau de la muqueuse nasale et des sécrétions salivaires. Une fois caractérisé, le modèle pourra apporter de nouvelles informations sur la pathologie, particulièrement au niveau pulmonaire et permettra de tester des stratégies thérapeutiques pour corriger les anomalies dues à la mutation

Le projet devrait nécessiter au maximum 30 animaux. Les résultats seront analysés en continu et si le seuil de significativité pour chacun des examens est atteint avant d'avoir atteint l'utilisation des 10 animaux, alors les procédures seront arrêtées.

Une attention particulière sera apportée à la gestion de la souffrance des rats de manière à la réduire au maximum grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques lors des procédures et à la mise en place de grilles de scores permettant la prise de décision pour les soins.

Ce nouveau modèle de rat devrait pouvoir fournir des informations sur les mécanismes de la pathologie, complémentaires de celles obtenues chez la souris, et servir comme modèle préclinique pour tester de nouvelles stratégies et de nouvelles molécules avant leur utilisation chez l'Homme.

**8920** La formation des internes de chirurgie du Diplôme d'Enseignement Spécialisé Complémentaire en chirurgie cardiaque, thoracique et vasculaire comprend parmi ses objectifs pédagogiques pratiques les items suivants :

-savoir réaliser les principales voies d'abord vasculaires

-savoir réaliser les principales procédures de réparation vasculaire et de drainage thoracique

-savoir réaliser un prélèvement multi organe

Il existe désormais l'obligation de ne plus faire, dans la mesure du possible, un geste pour la première fois chez l'homme, ce qui amène à envisager l'apprentissage par la simulation ou chez le gros animal. La simulation est une méthode pédagogique active et innovante, basée sur l'apprentissage expérientiel et la pratique réflexive. La Faculté de Médecine et le CHU disposent d'un centre de simulation, ouvert à l'ensemble des enseignant(e)s et praticiens qui souhaitent intégrer la pédagogie par la simulation dans leur programme d'enseignement.

C'est pourquoi nous avons imaginé une séance de formation pratique destinée aux internes de la spécialité chirurgicale cardiaque, thoracique et vasculaire (n=2 à 4 stagiaires).

Cette formation ayant lieu deux fois par an sur 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au total 10 porcs maximum sur la durée du projet.

Ce projet respecte le principe des 3R.

-Les alternatives de remplacement ont été étudiées. Malheureusement, l'apprentissage sur mannequin a ses limites, et dans le cas précis de la formation des jeunes chirurgiens, rien ne saurait remplacer les étapes de dissection et de prélèvement sur le vivant. Or, seul le modèle porcin offre une grande similarité avec l'homme sur le plan anatomique, notamment pulmonaire et cardiaque.

-alternatives de réduction : cette formation a été imaginée sur une seule journée (matin et après-midi) et nécessite un seul porc (10 max au total)

-raffinement : en vue de minimiser la douleur et le stress de l'animal, toute la procédure est réalisée sous anesthésie générale, sans réveil, avec euthanasie de l'animal en fin de procédure selon le protocole recommandé (cf infra).

Ce projet a été évalué par le comité d'organisation du DU de pédagogie et a reçu l'avis favorable du doyen de la faculté de médecine.

**8921** Les pathologies respiratoires, comme la pneumonie ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive ont un impact médico-social important, classées par l'organisation mondiale de la santé

parmi les dix principales causes de décès au niveau mondial. Le tableau clinique de ces maladies s'aggrave nettement dès lors que l'état du patient nécessite une assistance respiratoire. C'est le cas des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, infections respiratoires graves contractées à l'hôpital sous respiration artificielle. Les bactéries responsables sont des germes communaux très résistants aux antibiotiques comme le *Pseudomonas aeruginosa* ou le staphylocoque doré. Les traitements existants sont rarement curatifs ; l'atteinte du site infecté étant très limitée. Les traitements innovants utilisent des biomédicaments administrés par voie inhalée. Leur source est biologique : il s'agit des anticorps thérapeutiques, des protéines aux activités antibactériennes ou immunostimulantes, des bactériophages (virus des bactéries). La voie inhalée permet d'augmenter la concentration locale du biomédicament dans les poumons et minimiser leurs effets secondaires.

Le but de ce projet est d'évaluer/valider chez le primate non humain (PNH) ces nouvelles biothérapies administrées par inhalation dans des conditions expérimentales très proches de la clinique humaine. Selon les indications, les deux types d'administration seront étudiées : en ventilation spontanée chez l'animal vigile, et en ventilation mécanique chez l'animal intubé placé sous respiration artificielle. En effet, la répartition et la quantité de la biothérapie déposée dans les poumons seront différentes selon la ventilation associée (en ventilation artificielle = inhalation en position allongée au travers du tube endotrachéal (pas de passage par les voies aériennes supérieures).

Le PNH est un bon modèle pour évaluer le dépôt pulmonaire de médicaments car leur anatomie pulmonaire est très proche de celle de l'Homme. Le singe cynomolgus est choisi car : 1/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biothérapies, 2/ avec l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, 3/ d'un point de vue moléculaire, c'est la seule espèce où l'on observe une reconnaissance de la cible avec celle de l'homme (réactivité croisée). Cette interaction est indispensable au devenir de la biothérapie dans l'organisme (étude de sa pharmacocinétique).

Cette saisine envisage d'évaluer sur 5 ans, 5 biothérapies au maximum, nécessitant chacune 3 ou 6 animaux. Elle comprend 6 procédures expérimentales qui ont pour objectifs :

- De valider ou comparer des dispositifs d'inhalation ou des paramètres d'inhalation de la biothérapie
- De mesurer le dépôt pulmonaire (zone alvéolaire comprise) de la biothérapie inhalée en utilisant une méthode d'imagerie radio-isotopique.

- D'étudier la biodisponibilité et la pharmacocinétique de la biothérapie à partir des administrations pulmonaires et sanguines (voies inhalée versus intraveineuse)

Le plan expérimental établi répond à la règle des « 3R » :

- Remplacer : Des études in vitro réalisées en amont permettront de sélectionner uniquement les combinaisons les plus pertinentes pour être validées in vivo ;

- Réduire : l'objectif est d'obtenir des données qualitatives sur un petit nombre d'animaux (pas d'analyses statistiques) ; trois minimum étant nécessaires pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires). C'est le cas pour une validation de dispositifs ou paramètres où chaque animal sera son propre témoin. Pour une étude pharmacocinétique, 6 animaux seront impliqués (3 pour la voie pulmonaire et 3 pour la voie sanguine). Le nombre total impliqué sera fortement réduit dès lors que les animaux pourront être réutilisés pour plusieurs biothérapies (3 maximum si pas d'interaction entre biothérapies) en respectant des temps d'élimination adaptés.

- Raffiner : les administrations et les différents prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale. Toutes les procédures ont été optimisées de façon à n'induire aucune détresse/douleurs ou, le cas échéant, de les supprimer (prévention des appuis et de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaire, utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique, mise sous oxygène, administration d'antalgiques ...). Les animaux seront hébergés par groupes de 3 ou 6 en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Concernant l'enrichissement, les animaux disposent dans leur hébergement, de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets. La distribution de l'aliment couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises (fruits, légumes, pâtes, riz, pop-corn, céréales, graines de tournesol...) deux fois par jour. Les friandises données sont différentes le matin et l'après-midi, et d'un jour à l'autre. Il est possible d'en cacher certaines dans des jouets afin de stimuler la recherche alimentaire des animaux.

8922

Notre approche vise à stimuler les cellules progénitrices afin d'augmenter leur biodisponibilité sur le site de la fracture osseuse. Ceci peut être obtenu par l'ajout d'un biomatériau qui a un effet sur la multiplication cellulaire. Nous attendons de cette contribution quantitative, une stimulation de la consolidation des fractures, et des processus de régénération des tissus squelettique de manière plus générale.

Nous suggérons l'emploi du biomatériau suivant : verre bioactif 45S5. Ce biomatériau sera sous forme injectable putty (pâte composée de verre bioactif et de polymère de grade médical).

Le projet consiste à développer et exploiter un modèle expérimental de réparation de fracture chez le rat dans le but :

- d'étudier les mécanismes biologiques par lesquels les contraintes mécaniques régulent la formation de l'os au niveau du cal osseux ;

- d'élaborer un modèle permettant d'établir une loi d'évolution entre l'os sain et le cal osseux à partir de la caractérisation de leurs morphologies (imagerie), de leurs propriétés mécaniques, de leurs natures moléculaires et de leurs structures tissulaires.

Une fracture osseuse va être créée puis l'analyse de la réparation de cette fracture est analysée. Chaque rat remarche normalement après les chirurgies. Un rat par cage est utilisé. Un suivi de radio permet de voir si les os restent dans l'axe et si la consolidation se passe bien. Chaque animal est mis seul dans sa cage, il marche et se nourrit normalement. Les animaux sont euthanasiés après 7 semaines de consolidation.

Ce projet va nous permettre de déterminer les caractéristiques biomécaniques du cal osseux chez l'animal au cours de la réparation et d'apporter de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'évolution et la nature du cal osseux.

Nous avons choisi de mener notre expérimentation chez le rat pour différentes raisons :

- Dans la littérature, les études expérimentales portant sur la réparation de la fracture sont réalisées essentiellement sur le rat.

- Disponibilité des outils biologiques

Chez le petit animal, les modèles animaux de fracture au niveau du membre inférieur sont réalisés principalement chez le rat et chez le lapin. Toutefois, le modèle du rat s'avère le plus utilisé lorsqu'il s'agit d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le processus d'ostéogénèse compte tenu de la plus grande disponibilité des anticorps et de sondes moléculaires.

- Modèle de fracture chez le rat validé

De nombreux auteurs ont utilisé un modèle de fracture chez le rat pour étudier les mécanismes physiologiques, cellulaires et mécaniques. Ces auteurs ont validé le modèle de fracture de rat.

De plus, afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R sera appliquée. Ainsi, le plus faible nombre d'animaux possible sera inclus. 60 rats seront étudiés (4 groupes de 15 animaux). 15 avec le substitut osseux et 15 sans substitut pour l'analyse mécanique, 15 avec le substitut osseux et 15 sans pour l'analyse biologique. Ceci correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires pour effectuer un suivi pertinent du traitement et effectuer un traitement statistique des données. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence. Pendant la chirurgie, les yeux de l'animal seront protégés de la sécheresse. Durant toute l'opération l'animal est mis sur une couverture chauffante. Enfin, il sera positionné sous une lumière rouge le temps du réveil. Ce protocole est invasif donc pour permettre le bien être de nos animaux une constante surveillance sera faite tout au long du protocole afin de minimiser les sensations de douleur et d'inconfort. Des grilles de scores nous aideront à modifier notre protocole selon chaque individu. Dans notre protocole nous avons des injections d'analgésique sur une durée de trois jours après la chirurgie. Pendant la phase de consolidation cela n'est pas nécessaire sauf si l'animal montre des signes d'inconfort ou de "non bien-être". Les douleurs seront prises en charge grâce à l'ajout d'analgésiant mais seulement pour les scores inférieurs au seuil critique comme la perte de plus 20 % du poids du corps, sinon l'animal devra être euthanasié. Ils auront à disposition nourriture et eau, le cycle jour nuit sera respecté et la température ambiante sera de 22°C. Pour finir une petite balle en plastique pourra être mise dans la cage afin qu'ils puissent se divertir le temps où nous ne sommes pas présents.

Les pathologies respiratoires, comme la pneumonie ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive ont un impact médico-social important, classées par l'organisation mondiale de la santé parmi les dix principales causes de décès au niveau mondial. Le tableau clinique de ces maladies s'aggrave nettement dès lors que l'état du patient nécessite une assistance respiratoire. C'est le cas des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, infections respiratoires graves contractées à l'hôpital sous respiration artificielle. Les bactéries responsables sont des germes communaux très résistants aux antibiotiques comme le *Pseudomonas aeruginosa* ou le staphylocoque doré. Les traitements existants sont rarement curatifs ; l'atteinte du site infecté étant très limitée. Les traitements innovants utilisent des biomédicaments administrés par voie inhalée. Leur source est biologique : il s'agit des anticorps thérapeutiques, des protéines aux activités antibactériennes ou immunostimulantes, des bactériophages (virus des bactéries). La voie inhalée permet d'augmenter la concentration locale du biomédicament dans les poumons et minimiser leurs effets secondaires. Le but de ce projet est d'évaluer/valider chez le primate non humain (PNH) ces nouvelles biothérapies administrées par inhalation dans des conditions expérimentales très proches de la clinique humaine. Selon les indications, les deux types d'administration seront étudiées : en ventilation spontanée chez l'animal vigile, et en ventilation mécanique chez l'animal intubé placé sous respiration artificielle. En effet, la répartition et la quantité de la biothérapie déposée dans les poumons seront différentes selon la ventilation associée (en ventilation artificielle = inhalation en position allongée au travers du tube endotrachéale (pas de passage par les voies aériennes supérieures).

Le PNH est un bon modèle pour évaluer le dépôt pulmonaire de médicaments car leur anatomie pulmonaire est très proche de celle de l'Homme. Le singe cynomolgus est choisi car : 1/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biothérapies, 2/ avec l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, 3/ d'un point de vue moléculaire, c'est la seule espèce où l'on observe une reconnaissance de la cible avec celle de l'homme (réactivité croisée). Cette interaction est indispensable au devenir de la biothérapie dans l'organisme (étude de sa pharmacocinétique).

Cette saisine envisage d'évaluer sur 5 ans, 5 biothérapies au maximum, nécessitant chacune 3 ou 6 animaux. Elle comprend 6 procédures expérimentales qui ont pour objectifs :

- De valider ou comparer des dispositifs d'inhalation ou des paramètres d'inhalation de la biothérapie
- De mesurer le dépôt pulmonaire (zone alvéolaire comprise) de la biothérapie inhalée en utilisant une méthode d'imagerie radio-isotopique.

- D'étudier la biodisponibilité et la pharmacocinétique de la biothérapie à partir des administrations pulmonaires et sanguines (voies inhalée versus intraveineuse)

Le plan expérimental établi répond à la règle des « 3R » :

- Remplacer : Des études in vitro réalisées en amont permettront de sélectionner uniquement les combinaisons les plus pertinentes pour être validées in vivo ;

- Réduire : l'objectif est d'obtenir des données qualitatives sur un petit nombre d'animaux (pas d'analyses statistiques) ; trois minimum étant nécessaires pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires). C'est le cas pour une validation de dispositifs ou paramètres où chaque animal sera son propre témoin. Pour une étude pharmacocinétique, 6 animaux seront impliqués (3 pour la voie pulmonaire et 3 pour la voie sanguine). Le nombre total impliqué sera fortement réduit dès lors que les animaux pourront être réutilisés pour plusieurs biothérapies (3 maximum si pas d'interaction entre biothérapies) en respectant des temps d'élimination adaptés.

- Raffiner : les administrations et les différents prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale. Toutes les procédures ont été optimisées de façon à n'induire aucune détresse/douleurs ou, le cas échéant, de les supprimer (prévention des appuis et de l'hypothermie, monitoring cardio-pulmonaire, utilisation de matériel et techniques dédiées à la clinique humaine et pédiatrique, mise sous oxygène, administration d'antalgiques ...). Les animaux seront hébergés par groupes de 3 ou 6 en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Concernant l'enrichissement, les animaux disposent dans leur hébergement, de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets. La distribution de l'aliment couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises (fruits, légumes, pâtes, riz, pop-corn, céréales, graines de tournesol...) deux fois par jour. Les friandises données sont différentes le matin et l'après-midi, et d'un jour à l'autre. Il est possible d'en cacher certaines dans des jouets afin de stimuler la recherche alimentaire des animaux.

8924

Les mélanomes représentent 3,8% des tumeurs chez le cheval et affectent plus de 80% des chevaux gris âgés de plus de 15 ans. Le mélanome équin est un cancer d'évolution lente mais très métastatique et invasif notamment à proximité des gros vaisseaux (poches gutturales, grandes salivaires, viscères abdominaux). Il entraîne progressivement des douleurs et des troubles fonctionnels (en particulier digestifs), voire des hémorragies chez certains sujets. Les facteurs génétiques qui déterminent la robe grise favorisent l'apparition d'un mélanome malin chez le cheval âgé. Actuellement, il n'y a pas de traitement spécifique efficace des mélanomes équins et les chevaux affectés ont une espérance de vie réduite.

En oncologie humaine, il est reconnu que le facteur de succès principal du traitement du mélanome dépend avant tout de la précocité du diagnostic de la tumeur primaire pour appliquer un traitement rapide et efficace à un stade précoce du cancer. Chez le cheval, il n'existe pas de moyen de diagnostic précoce en dehors de l'observation clinique d'apparition des nodules primaires, le plus souvent localisés sur la face ventrale de la queue, la région péri-anale, la commissure des lèvres ou les paupières. Afin d'améliorer le bien être et la santé de nombreux chevaux atteints ou à risque de mélanome, il y a un besoin pratique de mettre au point une méthode de diagnostic précoce et, dans le futur, de traitement efficace.

Récemment, les ARN longs non codants (lncRNA) ont été identifiés comme de nouveaux régulateurs transcriptionnels modulant l'expression des gènes. Il a été démontré que les lncRNA jouent un rôle important dans divers processus biologiques, notamment la genèse, le développement et la progression des tumeurs. Des études menées chez l'homme ont montré une expression aberrante de lncRNAs fréquemment observée dans divers cancers, notamment les mélanomes ; plusieurs lncRNA pourraient être utilisés comme marqueurs pronostiques potentiels de cancer et représentent de nouvelles cibles thérapeutiques. En s'appuyant sur ces nouvelles pistes développées chez l'homme, ce projet a pour ambition d'approfondir les connaissances moléculaires du développement des mélanomes équins, de proposer une méthode de diagnostic précoce du mélanome par des analyses sanguines cytologiques et moléculaires et, si possible, démontrer la faisabilité en laboratoire d'un traitement génomique local.

Ainsi, ce projet comporte 3 actions qui ont chacune un objectif complémentaire :

1- Déterminer le rôle de trois familles de lncRNA (déjà connus chez l'homme et identifiés par notre équipe chez le cheval) dans le mécanisme d'oncogenèse du mélanome équin. Pour cela, une biopsie de mélanome sera effectuée à l'aiguille fine sur 15 chevaux gris atteints et une biopsie de peau saine sur 15 chevaux contrôles appariés. Un prélèvement sanguin sera réalisé sur tous les chevaux. Des analyses histologiques et moléculaires seront réalisées sur les prélèvements. Cet effectif est un compromis entre la variabilité interindividuelle, le coût des analyses et la puissance statistique du dispositif pour distinguer les deux groupes.

2- Identifier et valider des biomarqueurs sanguins cytologiques et moléculaires pour aider au diagnostic précoce et au pronostic du mélanome (croissance et métastases). Pour cela, un examen clinique approfondi et un prélèvement sanguin seront réalisés sur 100 chevaux à mélanome (soit 20 à 30 sujets par stade de gravité du mélanome) et 30 chevaux contrôles pour isolement des cellules tumorales circulantes, analyse de l'expression des biomarqueurs microRNA (miRNA) et lncRNA, et génotypage. Ce nombre de sujets est le minimum nécessaire pour réaliser une étude statistique valide et mettre en relation la gravité de la maladie avec l'intensité des biomarqueurs sanguins mesurés. Les résultats des analyses moléculaires seront mis en relation avec les informations cliniques.

3- Valider in vitro de nouvelles cibles thérapeutiques parmi les lncRNA candidats identifiés dans l'action 1. En utilisant des inhibiteurs des lncRNA qui jouent un rôle dans le développement du mélanome, il doit être possible d'inhiber la croissance de la tumeur primaire et d'éviter la formation de métastases si le cas est traité précocement. Ces traitements génomiques candidats seront évalués sur des cellules de mélanome équin cultivées en laboratoire.

Le cheval est l'espèce cible ; une partie des mécanismes moléculaire étant spécifique, il n'est pas possible d'utiliser une autre espèce ou de transposer les résultats connus dans d'autres espèces (remplacement impossible). En revanche, les actions 1 et 2 permettront de développer des cultures cellulaires qui seront utilisées pour l'action 3. Les chevaux seront recrutés dans des clientèles vétérinaires et ils retourneront dans leur écurie d'origine et poursuivront leur vie de cheval de sport

ou de loisir à l'issue de la procédure. Les biopsies seront réalisées sur cheval sédaté et sous anesthésie locale, et dans la mesure du possible, couplées au traitement chirurgical du mélanome (raffinement).

**8925** Ce projet consiste à tester une nouvelle approche d'immunothérapie dans le contrôle du développement d'une tumeur mammaire chez la souris. Un maximum de 120 souris de souche C57Bl/6 sera utilisé afin d'établir la preuve de concept de l'utilisation d'un composé X sur l'inhibition du développement tumoral. Pour cela, des cellules de carcinome mammaire seront injectées directement dans la glande mammaire des souris et, après installation et développement de la tumeur, les souris seront traitées par injection du candidat X.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 120 souris dans le respect de la règle des 3R. L'approche par imagerie, développée ici, permet de réduire le nombre d'animaux et de limiter leur souffrance. Cela implique que le projet soit effectué en plusieurs étapes et dans 2 établissements utilisateurs différents.

- Remplacement : Une approche in vitro a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Les souris sont anesthésiées à l'aide d'isoflurane pour l'implantation des cellules tumorales cependant tout type de médication pouvant interférer avec l'étude de la réponse immunitaire et/ou l'action du traitement X est proscrit.

**8926** Le projet a pour objectif de comprendre le rôle des neurones dopaminergiques dans l'activité locomotrice. La lésion des neurones dopaminergiques entraîne chez l'animal une perte d'activité locomotrice. Cette expérience et représente un très bon modèle d'étude de la maladie de Parkinson. Dans cette maladie, le malade perd la capacité d'initier ses mouvements et de les produire en harmonie. Un traitement des malades atteints de la maladie de Parkinson avec un précurseur de la dopamine permet une amélioration clinique avec restauration des capacités locomotrices.

Le modèle murin de lésion des neurones dopaminergiques permet d'observer un phénotype clair chez l'animal sur une durée de temps limitée et peut reproduire certaines des observations faites chez l'homme atteint de Parkinson. L'étude comportementale des souris unilatéralement lésées permet d'analyser finement divers comportements spontanés, de locomotion et de coordination motrice et ainsi de mieux comprendre les bases neurales de la maladie de Parkinson. Ce modèle permettra également d'analyser sans utilisation d'animaux supplémentaires des phénotypes cellulaires sur coupes de tissus après euthanasie des animaux et d'exploiter ainsi par de multiples approches comportementales et cellulaires chaque animal utilisé. Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires, notamment ceux résultant d'une mort neuronale, retrouvés dans des pathologies neurodégénératives chez l'homme telles que la maladie de Parkinson. Trente-quatre souris mâles de 8 semaines seront utilisées par an (soit 170 souris sur 5 ans). Cela représente incontestablement le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé. Ce projet occasionnera quelques effets néfastes modérés pour les animaux, de courte durée. L'expérimentation sera réalisée sur animaux anesthésiés et un traitement analgésique post-opératoire sera appliqué. Les animaux seront surveillés quotidiennement et maintenus dans un environnement protégé avant l'euthanasie en fin d'expérience. Leur vigilance et leur comportement seront surveillés et un traitement analgésique sera administré pendant plusieurs jours après la chirurgie. En cas d'absence de récupération attendue, l'expérimentation sera interrompue par euthanasie de l'animal.



**8927** Le diabète est devenu en quelques années une véritable épidémie touchant quelques 422 millions de personnes dans le monde. En France, on compte 5,1 millions de personnes concernées, soit près de 8 % de la population. Le diabète se caractérise par une hyperglycémie due soit à un défaut de production d'insuline soit à un manque d'efficacité de l'hormone. A long terme, ces deux situations conduisent à une destruction des cellules bêta, cellules sécrétrices d'insuline au sein de l'îlot de Langerhans. La restauration de cette masse des cellules bêta apparaît donc comme une thérapie potentielle très attractive. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régénération de ces cellules bêta conduira à de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement du diabète.

Notre projet de recherche vise à comprendre le rôle des 2 isoformes de lamines, la lamine A et la lamine C dans l'homéostasie du pancréas. Les lamines sont des filaments intermédiaires nucléoplasmiques qui participent à la structure du noyau et aux liaisons chromatine-membrane nucléaire. Jusqu'à présent, aucune étude n'a montré le lien direct entre les lamines et le contrôle de l'homéostasie pancréatique.

Dans une première étude, nous avons mis en évidence que les souris LCS qui n'expriment que la lamine C vivent plus longtemps que les souris contrôles et qu'elles développent une obésité au cours du vieillissement. Ce phénotype inattendu suggère que l'obésité observée chez ces animaux n'induit pas un diabète probablement parce que le pancréas est capable de compenser la production d'insuline en produisant plus de cellules bêta. Il est donc crucial d'explorer en détails les mécanismes qui conduisent à une telle adaptation, ce qui nécessite, sans alternative possible, l'utilisation de ce modèle murin LCS (*mus musculus*).

Cependant, ce projet sera conforme aux exigences des 3R, remplacement, raffinement et réduction. Pour le remplacement, nous envisageons d'utiliser, en parallèle de l'étude *in vivo*, des lignées cellulaires de cellules bêta (MIN6) dans lesquelles la lamine A sera inhibée par la technologie CRISPR/Cas9.

Pour la réduction, nous avons fait une analyse bibliographique poussée afin de définir les expériences à réaliser et nous avons mené une longue réflexion avec notre statisticien pour définir au mieux le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet. Nous allons utiliser 400 animaux. Notre étude, basée sur le métabolisme, impose que les études *in vivo* soient faites uniquement chez les mâles car les variations hormonales des femelles influencent fortement le métabolisme. Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, nous utiliserons également les femelles générées pour réaliser des cultures d'îlots de Langerhans *ex-vivo* afin de décortiquer les mécanismes moléculaires mis en place lors de cette adaptation.

Pour le raffinement, nous portons une attention toute particulière au bien être des animaux. Les animaux sont hébergés dans des conditions optimales intégrant tous les aspects garantissant le bien être animal : Les mâles sont hébergés au maximum 5 par cage et uniquement s'ils sont de la même fratrie. Les femelles sont regroupées uniquement si elles sont de même génotype et si elles n'ont pas une différence d'âge de plus d'un mois. Nous avons augmenté l'enrichissement du milieu avec des copeaux et des maisonnettes pour limiter au maximum le stress des souris. Les zootechniciens assurent une surveillance quotidienne basée sur l'observation des signes cliniques fondamentales et si besoin procèdent aux soins immédiatement afin de garantir le bien être des animaux.

Les protocoles sont soumis au comité d'éthique interne à notre institut et comportent notamment les points limites pour chaque expérimentation. Les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales.

**8928** Le tractus digestif des animaux est composé de nombreux microorganismes, majoritairement des bactéries, qui interagissent entre eux, mais aussi avec les cellules de l'intestin. Ces populations sont naturellement régulées par différents facteurs (compétition pour une niche écologique, attaque par le système immunitaire...). Mais elles sont aussi soumises à une prédation par des virus spécifiques. Parmi ces virus, ceux infectant exclusivement les bactéries sont dénommés bactériophages. L'étude des populations virales de l'intestin humain a révélé que les bactériophages représentaient la population dominante. La présence des bactériophages dès la naissance a été récemment confirmée, mais l'évolution en termes de quantité et de diversité de ces bactériophages au cours du

temps, et leur rôle dans l'équilibre des populations bactériennes de l'intestin, sont aujourd'hui totalement inconnues.

Néanmoins, nous savons que les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) présentent des altérations de la richesse et de la diversité des bactériophages dans leurs intestins, suggérant qu'ils seraient impliqués dans ces maladies sans qu'on sache toutefois s'ils seraient la cause ou la conséquence.

Nous savons aussi que le tractus digestif humain est utilisé par certaines bactéries pathogènes pour s'y dissimuler, une situation dénommée portage.

Enfin, au cours des dernières années le nombre de bactéries résistantes à de multiples antibiotiques a considérablement augmenté, et nombre d'entre elles sont retrouvées dans le tube digestif. Les voyageurs qui visitent des pays où le taux de résistance est élevé portent ces germes dans leur tube digestif, favorisant ainsi la dissémination mondiale des bactéries résistantes.

Notre projet a pour objectif d'étudier les interactions dynamiques entre les bactéries et les bactériophages afin d'apporter des connaissances précises sur a) leur rôle dans le tube digestif et b) leur utilisation potentielle dans le traitement et la prévention d'infections bactériennes.

Ces études nécessitent l'utilisation de modèles murins de colonisation intestinale car il n'existe aucune alternative qui propose un environnement similaire à celui du tube digestif, c'est-à-dire à la fois une flore complexe, une interaction avec les cellules épithéliales, un flux digestif et une réponse immunitaire. Les souches bactériennes utilisées, *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae*, ne sont pas des pathogènes naturels de la souris et ne causent pas d'infection du tube digestif murin conduisant à une classification légère pour 1732 souris. Cependant nous utiliserons aussi des molécules pro-inflammatoires afin de mimer la situation clinique de déséquilibre microbien observée chez les patients atteints de MICI, conduisant donc à une classification en sévérité modérée pour 720 souris. Des prélèvements sanguins seront effectués pour évaluer le degré d'inflammation. Toutes les souris seront euthanasiées à la fin de l'étude et les organes intestinaux prélevés. Enfin dans certains cas nous comparerons l'efficacité des bactériophages à un traitement de référence par antibiotique. Le nombre total de souris sera de au plus de 2452 sur une durée de 5 ans avec comme objectif de réduire ce nombre par le raffinement des protocoles expérimentaux développés au cours de ce projet. Par exemple, le nombre de points d'observation pourrait être réduit.

**8929** Le sepsis (association d'une infection et d'une réaction inflammatoire systémique) est une pathologie grave dont l'incidence ne cesse d'augmenter et qui demeure la principale cause de mortalité en réanimation. Les patients survivant au sepsis peuvent présenter des séquelles lourdes comme des séquelles cognitives ou un déficit fonctionnel dans le cadre d'une pathologie appelée neuromyopathie de réanimation (NMR), ou ICU-acquired weakness. Plus d'un tiers des patients survivants atteints de cette NMR conservera des séquelles lourdes, comme l'impossibilité de marcher ou de respirer seul. Les effets du sepsis sont systémiques et complexes, et il est très difficile de modéliser ces interactions ou de les reproduire de façon fiable *in vitro*. Il est donc nécessaire de disposer de modèles animaux reproduisant au mieux ces interactions. Jusqu'à présent, c'est le modèle de ligature et perforation caecale qui était utilisé dans le laboratoire ainsi que par de très nombreuses équipes à travers le monde. Cependant, la variabilité de ce modèle de même que la souffrance infligée aux animaux nous incite à adopter un nouveau modèle animal. Notre choix s'est porté sur le modèle d'injection de fèces à partir du contenu caecal, récemment publié.

Le but du projet est donc de poursuivre la caractérisation des effets musculaires et neuropathologiques du sepsis dans un modèle murin simple, reproductible et source de moins de souffrances pour les animaux. La compréhension de ces mécanismes permettra une meilleure prise en charge de ces patients et à terme une diminution de la mortalité et morbidité associée.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins transgéniques ou non, avec un total de 692 animaux sur une période de 5 ans, afin de réaliser deux procédures expérimentales de classe modérée :

- Procédure de mise en place et de caractérisation du modèle : 80 souris
- Procédure expérimentale consistant en l'analyse des effets sur le système nerveux central, d'un sepsis induit par l'administration intrapéritonéale d'un broyat de fèces : 612 souris

Les populations seront adultes avec un âge moyen de 10 semaines, et elles comprendront à la fois des mâles et des femelles afin d'être représentatif de la population générale et de pouvoir extrapoler les résultats.

Nous mettrons en œuvre pour chaque expérimentation : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaires par groupe d'expérimentation, 2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une mise à mort (utilisation de la Grille d'une grille d'évaluation douleur, stress inconfort CETEA /SBEA /IP pour monitorer l'état des animaux (Appearance, et Body Weight si score Appearance >0); dès que le score atteindra 2 pour l'un des deux critères, les animaux concernés seront euthanasiés), 4) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 5) une valorisation de chaque animal avec un partage des prélèvements par nos différentes équipes de recherche.

**8930** Les deux dernières décennies ont vu les staphylocoques et les entérocoques devenir des pathogènes nosocomiaux majeurs. L'utilisation massive d'antibiotiques à large spectre avec une couverture principalement dirigée contre les bactéries Gram négatif, a facilité l'apparition de staphylocoques multi-résistants. Dans les centres de soin, les médecins traitants se trouvent face à un problème avec peu de solutions à leur disposition, rappelant l'époque précédant l'apparition des antibiotiques. Cette situation a poussé les organismes sanitaires Européens et Nord-Américains à classer *S. aureus* comme une des 25 priorités de recherche en santé humaine. Afin d'étudier les infections des tissus humains par *S. aureus* ou *E. coli* ainsi que les interactions hôte pathogènes à travers le système immunitaire, les chercheurs ont adopté le modèle murin, faute de mieux et malgré le fait que les souris ne soient pas un hôte naturel de *S. aureus* et qu'elles soient naturellement résistantes à l'établissement d'une septicémie semblable à celle observée chez l'homme.

Les modèles de souris humanisées pour le système immunitaire (souris HSI) sont une alternative aux modèles murins classiques. Les souris HSI reposent sur la xéno-transplantation de cellules souches hématopoïétiques humaines chez des souris particulièrement permissives à l'établissement durable des cellules humaines transplantées, permettant la génération et le maintien à long terme de différents lignages du système immunitaire humain –notamment lymphocytes T, lymphocytes B (sources des immunoglobulines), cellules NK ou cellules dendritiques.

Le recours aux souris HSI permet d'approcher des éléments de la physiologie humaine de manière expérimentale et prospective. Ce modèle représente une plate-forme pré-clinique attrayante pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, comparativement aux primates non-humains (considérations éthiques, coût élevé). En outre, de nombreuses évolutions technologiques ont été appliquées sur les souris HSI au cours de la décennie, améliorant la fiabilité de ce modèle et réduisant significativement la variabilité inter-individus. Les souris HSI donnent donc un accès de plus en plus pertinent à l'analyse des réponses immunitaires humaines *in vivo*, en particulier les mécanismes d'inflammation et les interactions avec les agents pathogènes.

En résumé, l'objectif majeur de ce projet consiste à infecter les souris HSI avec *S. aureus* et *E. coli* et reproduire les conditions inflammatoires humaines accompagnant l'état septique des patients affectés. Dans ce système, des stratégies immuno-modulatrices seront explorées par administration d'anti-inflammatoires ou d'adjuvants afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques (immunothérapies ou vaccins).

Il est prévu d'utiliser 70 souris HSI par an pour ce projet (total de 350 animaux sur 5 ans).

Les agents infectieux vont être transformés pour devenir bioluminescents (ou fluorescents). L'utilisation par la suite des outils et des méthodes d'imagerie *in vivo* pour la détection et la visualisation de processus d'infection/thérapie permet de réduire considérablement le nombre de souris à utiliser et permettra en même temps un suivi quotidien non invasif de l'infection.

Une seule procédure expérimentale de classe sévère sera mise en œuvre durant ce projet (induction du modèle HSI). Toutes les autres interventions sont de sévérité légère à modérée et ne requièrent ni anesthésie ni analgésie ; seule une surveillance attentive est nécessaire. Des examens quotidiens et détaillés de l'animal avant qu'il ne devienne moribond permettront d'établir des points limites précoces et, en conséquence, de réduire la souffrance de l'animal. Un score clinique, établi en fonction de l'observation de plusieurs paramètres (état général, posture, signes oculaires, troubles

locomoteurs), sera établi. Si certains de ces signes sont observés, et, en fonction de leur sévérité, des décisions graduelles seront enclenchées : couverture chauffante, injection d'analgésiques, euthanasie. Les animaux euthanasiés à la fin de l'expérimentation donneront accès aux organes internes infiltrés par l'infection. Les souris seront euthanasiés à la fin de l'étude.

**8931** Le cancer de la prostate est la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité chez l'homme en France. A l'heure actuelle le diagnostic repose sur un suivi par dosage sanguin des PSA (Prostate Specific Antigen ou Antigène Spécifique de la Prostate). En cas de suspicion de cancer, le médecin procède à une série de biopsies. Dans la plupart des cas, les biopsies sont réalisées par prélèvements aléatoires « en aveugle » dans les lobes prostatiques (10 à 12 prélèvements) mais le taux de réussite (identification de cellules cancéreuses) est d'environ 60%. L'objectif de notre projet est de développer une sonde d'imagerie spécifique du cancer de la prostate qui permettra de guider les biopsies et d'améliorer le taux de réussite. Cette sonde correspond à des nanoparticules sur lesquelles sera greffé un fragment d'anticorps qui reconnaît spécifiquement une protéine surexprimée dans le cancer de la prostate. Notre outil sera d'abord validé sur des cellules en culture pour son efficacité et surtout pour son absence de toxicité avant d'être testé sur des animaux. Nous utiliserons des cellules tumorales de cancer de la prostate d'origine humaine et génétiquement modifiées. Ces cellules seront injectées aux souris pour générer des tumeurs sous cutanées et dans la prostate par chirurgie. Pour nous permettre de suivre la croissance des tumeurs mais également la sonde que nous aurons développée, nous utiliserons des techniques d'imagerie optique qui sont non invasives et qui permettent de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 66 souris : 30 modèles sous cutanés (5 lots de 6 souris) et 36 modèles de tumeur dans la prostate (3 lots de 12 souris).

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et de ce fait ils ne peuvent être remplacés. Les nanoparticules sont testées en amont sur des cellules en culture pour s'assurer de leur non toxicité mais également de leur efficacité. Ainsi seules les nanoparticules ayant démontré leur efficacité sur les cellules seront injectées aux souris. La pousse tumorale ainsi que le devenir des nanoparticules une fois injectées dans la souris seront évaluées grâce à l'imagerie optique. C'est une méthode non invasive qui permet de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'étude. La possibilité d'injecter 2 tumeurs sous cutanées sur un même animal nous permet également de réduire le nombre d'animaux utilisés au final. C'est seulement une fois que les conditions expérimentales auront été déterminées avec le modèle sous cutané que nous envisagerons de passer au modèle de tumeur dans la prostate, qui est un modèle plus lourd à mettre en place. Les animaux sont suivis quotidiennement par l'expérimentateur et/ou le personnel de l'animalerie. Les animaux sont hébergés en fratrie dans le respect de leur bien être avec un enrichissement du milieu (jouet) fourni par l'animalerie. Dans le cas de l'acte chirurgical d'implantation dans la prostate, une analgésie est mise en place au moment de la chirurgie avec un suivi post-opératoire quotidien. Au moindre signe de souffrance ou de mal être de l'animal l'expérimentation sera stoppée.

**8932** *Yersinia pestis*, l'agent pathogène de la peste, est une des bactéries les plus mortelles pour l'homme. La peste n'a pas disparu et a été récemment incluse dans la liste des maladies ré-émergentes. De plus, *Y. pestis* a été classé parmi les trois armes bactériologiques potentielles pour usage bioterroriste. Du fait que des isolats de *Y. pestis* résistants à de nombreux antibiotiques ont été observés ou pourraient être générés dans l'intention de nuire, la vaccination contre la peste pourrait devenir le seul moyen de combattre l'infection, mais aucun vaccin efficace et sûr n'est actuellement disponible.

Nous avons développé une stratégie de vaccination orale avec une souche vivante atténuée de *Yersinia pseudotuberculosis*, une espèce génétiquement presque identique à *Y. pestis*. Pour cela, une *Y. pseudotuberculosis* atténuée nommée VTnF1 a été construite en délétant les gènes codant trois facteurs associés à la virulence. VTnF1 a aussi été induite à produire stablement la pseudocapsule F1 de *Y. pestis* afin d'augmenter son immunogénicité. Une dose orale unique de ce vaccin protège les souris à 100% contre une peste pulmonaire mortelle, et à 100% contre la peste bubonique.

Avant de pouvoir effectuer des tests cliniques du vaccin chez l'homme, des tests réglementaires de toxicologie sur l'animal sont exigés. Ce type de tests est souvent effectué sur le rat car leur taille permet des tests multiples. Le rat est d'autant plus adéquat qu'il est sensible à la peste et en est le réservoir naturel dans la nature. Afin de valider le concept de ces tests chez le rat, nous devons démontrer que le vaccin est actif chez cette espèce. Pour cela, le travail consiste en la vaccination de rats et l'étude de la réponse immunitaire acquise par vaccination. Les tests de cette réponse immunitaire requièrent une simple prise de sang. Les rats vaccinés seront finalement exposés à une infection d'épreuve pesteuse bubonique ou pulmonaire pour déterminer si l'immunité acquise est protectrice.

Le bénéfice attendu du projet est une démonstration de l'immunogénicité du vaccin contre la peste chez le rat, justifiant la possibilité d'effectuer les tests toxicologiques chez cette espèce.

Afin de s'assurer d'utiliser seulement le nombre d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé, la réponse immunitaire et la protection de chaque animal seront testées. Le projet utilisera au maximum 120 rats femelles (*Rattus norvegicus*) sur trois ans. Ce nombre repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Des femelles seront utilisées seulement car elles sont moins agressives.

Les rats seront maintenus dans un environnement protégé (animalerie A3) pour contrôler le risque infectieux. Ils seront hébergés à un ou deux par cage, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

Les dommages prévisibles pour les animaux découlent de l'infection, car les deux formes de peste testées (bubonique et pulmonaire) sont mortelles pour le rat. Il est difficile ici de minimiser les atteintes au bien être des animaux car la maladie doit se dérouler normalement pour que les conclusions attendues des expériences puissent être tirées. Le niveau de sévérité attendu est sévère (peste), mais uniquement si le vaccin testé ne protège pas. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude. Le recours à l'animal est nécessaire car l'infection est la seule manière de déterminer l'efficacité du vaccin. En effet, autant la pathogénèse pesteuse que l'immunité protectrice sont multifactorielles et ne peuvent se réduire à un ou des modèles in-vitro.

L'infection provoque des effets cliniques inévitables. La recherche de points limites (signes cliniques, etc) annonçant la mort sera effectuée. S'il est possible de définir de tels points, les animaux qui les atteignent seront euthanasiés.

**8933** De nos jours, de nombreuses maladies transmissibles sévissent encore de par le monde. Quelle que soit l'origine de l'agent infectieux (virus, parasites ou bactéries) et le mode de transmission (directe ou indirecte), de nouvelles épidémies dues à ces pathogènes émergents ou ré-émergents se succèdent et sont responsables de nombreuses morts. Dans tous les cas, des mesures préventives sont nécessaires pour diminuer la morbidité et limiter la propagation des pathogènes. Que l'infection se présente sous forme d'épidémie très localisée ou plus disséminée, la vaccination prophylactique reste une des meilleures solutions pour empêcher son expansion.

Les vecteurs lentiviraux (VL) dérivés du virus de l'immunodéficience humaine sont des vecteurs particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Le but de ce projet est de vectoriser des antigènes issus du virus Zika dans un VL et d'utiliser ces VL recombinants pour induire une immunité protectrice. Ces vaccins potentiels pourront être utilisés non seulement comme vaccins vétérinaires pour limiter la propagation de la maladie chez l'animal mais également chez l'homme pour protéger des complications neurologiques et des malformations congénitales observées chez les femmes enceintes. Afin de limiter le nombre de VL recombinants à évaluer, nous aurons recours à des analyses informatiques pour identifier les cibles vaccinales. Pour déterminer si ces vecteurs sont capables d'induire des réponses immunitaires protectrices, nous devons les tester dans un organisme vivant infectable par le pathogène étudié. Les données de la littérature montrent que l'infection par le virus Zika peut être reproduite chez la souris. Nos précédents travaux de recherche soulignent que l'injection de VL n'induit aucune pathologie chez cette espèce animale. Nous utiliserons donc des souris adultes pour définir la construction lentivirale la plus efficace à induire une immunité protectrice contre le virus Zika.

Une première procédure expérimentale de classe modérée permettra de déterminer le ou les antigène(s) impliqué(s) dans la protection vis-à-vis du pathogène étudié. Dans ce projet, nous

prévoyons d'étudier au maximum 3 constructions lentivirales différentes sur une période de 5 ans. Dans la mesure du possible, les différentes constructions seront évaluées en parallèle et les groupes contrôles partagés pour limiter le nombre de souris. Par ailleurs, une étape systématique de contrôle de qualité de chaque lot de vecteur produit sera effectuée. Ceci inclut la vérification du transfert de gène après transduction in vitro d'une lignée cellulaire et l'expression du transgène par cytométrie en flux ou western blot, garantissant ainsi la reproductibilité des résultats obtenus chez l'animal. Une fois le ou les meilleur(s) antigène(s) issus du virus Zika identifié(s), une autre série d'expérience sera menée pour déterminer la dose de VL recombinant donnant la meilleure réponse protectrice chez la souris. Dans ces expériences, une caractérisation fine des réponses immunitaires sera réalisée après l'injection des VL. Cette procédure de sévérité modérée permettra également de définir la dose optimale à utiliser pour l'évaluation de la protection vis-à-vis du virus Zika et de limiter le nombre de doses (et de souris) à injecter dans la deuxième procédure.

Une deuxième procédure de classe sévère va nous permettre d'évaluer la capacité stérilisante du VL candidat in vivo. Après immunisation par le(s) VL recombinant(s), une épreuve virulente sera réalisée en injectant le pathogène actif. Dans une première série d'expériences, cette protection sera évaluée à court terme. Pour cela, l'infection par le pathogène sera réalisée 1 mois après la primo vaccination. L'infection par le virus Zika aboutissant à la mort des animaux, des points limites décrits dans la littérature seront utilisés. Les animaux seront surveillés quotidiennement et seront euthanasiés dès l'apparition des points limites.

En cas de protection par le(s) VL recombinant(s), nous évaluerons dans une deuxième série d'expériences, l'immunité mémoire en réalisant l'infection par le pathogène 6 mois après la primo-vaccination. Les paramètres de suivi seront identiques à ceux utilisés dans la première expérience. L'obtention d'une protection de l'infection par le virus Zika lors de cette deuxième procédure validera le VL recombinant comme candidat vaccin. Par contre, des travaux préliminaires du laboratoire montrent que la réponse immunitaire induite par les VL est largement sous-estimée chez la souris. Pour définir la dose à injecter chez le primate ou chez l'homme, une troisième procédure sera réalisée. Cette expérience de dose/réponse sera réalisée chez le rat qui n'affiche pas la restriction d'espèce observée chez la souris. Le fait d'avoir défini l'antigène et le nombre d'immunisation lors des procédures n°1 et n°2 nous permettra de réduire le nombre de rats à immuniser.

Pour réaliser ces trois procédures, nous estimons le nombre d'animaux de laboratoire auxquels nous aurons recours, à environ 372 souris et 120 rats, dans des procédures de sévérité modérée et de 224 souris dans une procédure de classe sévère sur une durée de 5 ans. Des tests statistiques (Anova) seront utilisés pour comparer les résultats immunologiques induits par les différents protocoles de vaccination et valider le candidat vaccin.

Cet effectif permettra d'identifier un vaccin prophylactique contre l'infection Zika et de définir la dose à utiliser chez l'homme.

**8934** Quand il devient chronique et/ou excessif, le stress peut mener à un mal être, à des situations extrêmes de souffrances (burnout, dépression, anxiété, troubles de stress post-traumatique) qui, dans leurs expressions pathologiques, forment les troubles anxiodépressifs. Ils représentent les troubles neuropsychiatriques les plus fréquentes et sont la cause la plus importante d'invalidité dans le monde. Leur prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et il s'agit de la famille de pathologies la plus coûteuse notamment en raison de leur persistance et de leurs coûts indirects (50% des arrêts maladies en Europe sont dus au stress et aux troubles associés). Ces troubles sont généralement traités par des pharmacothérapies basées sur l'administration d'antidépresseurs. Toutefois, si ces traitements sont efficaces pour une partie des patients (jusqu'à 50%), ils le sont peu chez une proportion importante de patients (insensibilité partielle ou totale). Ainsi, le stress et les troubles associés posent un problème majeur de santé publique, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

Ainsi, notre projet s'inscrit dans un programme de recherche visant à comprendre ces mécanismes. Nous avons précédemment identifié l'hippocampe comme une structure clé pour les effets antidépresseurs, notamment pour sa capacité à contrôler la réponse au stress. Toutefois les circuits cérébraux sous-tendant ce contrôle n'ont pas encore été caractérisés. Or le bon fonctionnement de

ce contrôle est requis pour l'action thérapeutique des antidépresseurs chez les patients et dans les modèles animaux.

Les études neuroanatomiques montrent qu'il n'y a pas de projections directes de l'hippocampe vers la zone cérébrale responsable du déclenchement de la réponse au stress (appelé hypothalamus). Par contre, des voies indirectes (à 2-3 synapses) via des structures intermédiaires ont été suggérées. Ces structures intermédiaires sont au nombre de 5 et comprennent le septum latéral (LS), le noyau lit de la strie terminale (BNST), l'aire préoptique médiane (mPOA), l'hypothalamus dorso-médian (DMH) et latéral (LH). Toutefois, le rôle de ces structures intermédiaires dans le contrôle de la réponse au stress par l'hippocampe n'a jamais été établi.

Ainsi le but des procédures décrites dans cette saisine sera de caractériser chez la souris ces circuits à travers des techniques de traçages, puis d'explorer leur fonction (comportementale et physiologique) à travers des techniques optogénétiques. La souris est un mammifère dont les structures cérébrales présentent une forte homologie avec l'homme, et donc une espèce animale appropriée pour modéliser la réponse au stress et d'en étudier les circuits et mécanismes.

L'effectif total maximum pour la totalité du projet de cette saisine est de 254 souris.

**Remplacement** L'identification précise des circuits cérébraux et l'évaluation des effets comportementaux et cognitifs du stress chronique (et de son traitement) peuvent uniquement être réalisées dans des cerveaux entiers et chez des organismes vivants. Le choix de l'espèce animale utilisée s'est donc portée sur la souris, mammifère dont les structures cérébrales et les fonctions cognitives présentent suffisamment d'homologie avec l'homme pour modéliser la réponse au stress et d'en étudier les mécanismes.

**Réduction** : Les effectifs sont optimisés et réduits en tenant compte de la variabilité comportementale inter-individuelle, de celle due aux injections/implantations intracérébrales dans des structures fines (de l'ordre du 50  $\mu\text{m}$ ) et d'une puissance statistique suffisante. Pour l'approche de traçage neuroanatomique, un nombre réduit d'animaux par structure cible est suffisant (n=6 maximum par sous-structures cibles) : 2 zones du LS, 3 zones du BNST, 2 zones du mPOA, 1 zone du DMH et 1 zone du LH (donc 54 souris au total). Pour l'implication fonctionnelle et l'optogénétique, des effectifs d'environ 20 souris par groupe seront nécessaires. On utilisera donc pour chaque structure visée 20 souris témoins et 20 souris stimulées (n=40/structure).

**Raffinement** : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (animaux maintenus en grande cages, avec objets, tube et abris). Les injections intracérébrales se feront sous anesthésie générale et seront réalisées par des chercheurs formés et expérimentés. Les soins opératoires et le suivi post-opératoire seront effectués à travers une procédure standard rigoureuse et une observation appuyée des animaux afin d'optimiser la gestion de la douleur, de réduire au maximum l'inconfort et d'éviter/traiter toute infection. Par la suite, les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement optimales et ne seront sujets à aucune procédure pouvant affecter leur bien être ou causer des douleurs. D'un point de vue scientifique, l'optogénétique représente la méthode de ciblage de populations neuronales la plus spécifique et la plus éthique actuellement (en comparaison aux méthodes traditionnelles électrolytiques ou chimiques de lésion cérébrale, bien plus traumatiques pour les tissus).

**8935** Les biomatériaux de substitution osseuse sont étudiés afin de développer des produits de substitution osseux utilisés chez l'Homme lors de fracture ne cicatrisant pas spontanément, afin d'obtenir une arthrodeuse (intervention chirurgicale visant à immobiliser définitivement une articulation), de combler une perte osseuse trabéculaire dans certaines affections comme l'ostéoporose... Il est possible, dans ces indications, d'utiliser des autogreffes, des allogreffes voire des xénogreffes. Toutefois, le volume de l'autogreffe est limité et il a été montré que le site de prélèvement est à l'origine chez un certain nombre de patients de douleurs importantes pouvant persister pendant plusieurs mois (11% à 1 an). Pour les allogreffes et les xénogreffes, le problème de la stérilisation sans dénaturer la structure osseuse est primordial pour éviter la transmission de maladies et n'est toujours pas parfaitement résolu. C'est pourquoi, l'utilisation des biomatériaux de synthèse est une voie de développement. Les biomatériaux que nous étudions font toujours l'objet d'études in vitro en préalable des études in vivo. Ces études in vitro permettent d'éliminer certains biomatériaux en raison d'effets délétères.

Néanmoins, une étude in vivo est nécessaire avant l'utilisation en chirurgie humaine afin d'apprécier les effets et les interactions sur un organisme vivant. Il s'agit d'ailleurs d'une recommandation de la norme ISO 10993-6 lors du marquage CE. Le lapin, les petits ruminants et le chien sont les espèces les plus utilisés dans ces modèles in vivo.

Ces modèles animaux correspondent donc à des modèles que nous réalisons depuis des années et plusieurs fois par an afin d'étudier :

- \* un nouveau biomatériau (face à un matériau de référence),
- \* l'adjonction de principe actif ou de cellules à un biomatériau connu afin d'améliorer sa bioactivité,
- \* l'effet d'un traitement par voie parentérale concomitant à ces implantations...

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

Les biomatériaux implantés font l'objet d'une étude préalable in vitro avant d'être implantés chez l'animal afin de réaliser une première sélection.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum grâce à l'utilisation de statistiques non paramétriques et en veillant à réduire la variabilité.

La réalisation des interventions par des chirurgiens vétérinaires expérimentés permet de réduire le traumatisme chirurgical. Outre la gestion de l'analgésie pré et postopératoire, l'état général et clinique des animaux est surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un vétérinaire pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière permet la mise en place, si nécessaire, d'un traitement le plus précocement possible. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

Les tests statistiques non paramétriques permettent de travailler sur des effectifs faibles et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Sur la période de 5 ans, 90 petits ruminants (caprins et ovins) seront utilisés.

**8936** Les infections bactériennes de la mamelle sont responsables d'une inflammation (ou mammite) et sont fréquentes chez les brebis en lactation. Les bactéries les plus fréquemment impliquées sont des staphylocoques, notamment *Staphylococcus aureus*. Outre les troubles sanitaires qu'elles engendrent chez les animaux atteints, ces infections sont également responsables d'une diminution de la qualité sanitaire et technologique du lait (aptitude à la transformation fromagère), car leur évolution est le plus souvent chronique.

La maîtrise des mammites représente donc un enjeu majeur pour l'élevage laitier, non seulement pour l'amélioration de la santé et du bien-être des animaux, mais aussi pour des raisons économiques et réglementaires. En plus des mesures d'hygiène classiquement mises en œuvre pour diminuer l'incidence des infections mammaires, la sélection d'animaux présentant une résistance accrue aux mammites a été mise en place dans les programmes d'amélioration de plusieurs races laitières en France. Cependant, la résistance aux mammites est un caractère complexe dont le déterminisme génétique reste mal connu. Dans l'espèce ovine, une mutation ponctuelle du gène *Socs2*, par ailleurs très conservé chez les mammifères, a été identifiée avec une fréquence élevée dans la population générale et semble avoir une influence sur le contrôle de l'inflammation mammaire, sans que les mécanismes physiologiques impliqués ne soient connus avec précision.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de déterminer quels sont les mécanismes immunitaires, locaux (dans la mamelle) et généraux, sur lesquels la mutation ponctuelle du gène *Socs2* a une influence, et dont la régulation pourrait expliquer une meilleure résistance aux mammites. Pour cela, en l'absence de modèle in vitro ou ex vivo capable de reproduire les réponses inflammatoire et immunitaire ayant lieu à l'échelle de l'organisme suite à une infection mammaire, le recours aux animaux est nécessaire. En outre, étant donné que la mutation du gène *Socs2* concernée n'a pour l'instant été identifiée que dans l'espèce ovine, le modèle retenu sera la brebis. Seules des brebis primipares seront utilisées afin de maximiser la probabilité que leur glande mammaire soit exempte d'infection et d'inflammation chroniques en début d'expérimentation.

Ainsi, 20 brebis primipares, réparties en 2 groupes de 10 en fonction de leur génotype *Socs2* (homozygotes pour le gène sauvage ou pour le gène muté), seront transférées sur le site d'expérimentation 3 semaines avant d'être inoculées par voie intramammaire avec une souche de *Staphylococcus aureus*. Cette période d'acclimatation leur permettra de s'habituer à leurs nouvelles conditions d'élevage, caractérisées par un hébergement sur aire paillée (2 m<sup>2</sup>/animal) équipée de



brosses fixées aux murs sur lesquelles elles pourront se frotter et par une alimentation composée de foin à volonté et de 700 g/animal/jour de granulés de céréales.

Durant les 15 jours suivant l'inoculation, chaque brebis fera l'objet d'un suivi sanitaire individuel rigoureux, basé sur un suivi en temps réel de la température corporelle grâce à un dispositif (bolus) mis en place dans la panse, complété par des examens cliniques complets biquotidiens. En parallèle, des prélèvements de lait et de sang seront réalisés quotidiennement pour évaluer la cinétique d'activation de différents marqueurs de l'inflammation et des effecteurs cellulaires de l'immunité. L'expression des gènes sera également mesurée dans le sang, afin de suivre l'évolution de l'infection. A la fin de l'expérimentation, toutes les brebis seront euthanasiées par injection intraveineuse de pentobarbital, puis des prélèvements d'organes seront réalisés post mortem pour analyses complémentaires.

Grâce à l'optimisation des effectifs, calculés de manière à permettre une interprétation statistique des résultats en utilisant le moins d'animaux possible, la comparaison des données cliniques, hématologiques et/ou biologiques entre les 2 groupes expérimentaux devrait permettre de mieux comprendre les bases physiologiques de la résistance aux mammites liée au gène *Socs2* chez les ovins.

**8937** Cette série de travaux pratiques a vocation d'enseigner les bonnes pratiques en expérimentation animale sur modèle rongeur (contention, préhension, prélèvement, analgésie, soins ...) dans le but de minimiser les contraintes exercées aux animaux.

Cet enseignement est dispensé pour des formations spécifiques destinées aux personnes concevant et réalisant des procédures expérimentales sur modèle rongeur mais également aux personnels appliquant des procédures chirurgicales. Il prend place dans la réglementation (Directive 2010/63/UE Article 23 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) qui définit l'adéquation des compétences du personnel par rapport à la fonction exercée et délivre une attestation valable pour le suivi des compétences.

Pour ces 3 formations, les stagiaires mettront en pratique les notions abordées lors des cours théoriques qui précèdent les travaux pratiques. Ils réaliseront les différentes étapes d'apprentissage sous la supervision d'un ou deux encadrants.

Ce projet regroupe les différents travaux pratiques abordés lors de ces 3 formations, et pour rendre le contenu plus lisible chacun est détaillé dans une procédure. Un TP est réalisé lors de la formation « opérateur », un TP lors de la formation « concepteur » et 6 TP lors de la formation « spécialisation en chirurgie ».

On estime le nombre maximum de 1785 rats et 1450 souris qui seront utilisés pour tous les TP pendant la durée totale du projet (5 ans) soit 90 sessions de formation. Ce chiffre est un chiffre maximum et peut varier à la baisse en s'adaptant au nombre de stagiaires.

Cet enseignement s'inscrit dans la démarche des 3R :

- Raffinement :

Une attention toute particulière est portée pour la diminution des contraintes exercées aux animaux. Réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse :

Afin de limiter le stress, les animaux intègrent la zone d'hébergement plusieurs jours avant le début des formations (en général 7 jours).

Afin de minimiser l'angoisse de certains animaux dus au contexte d'une activité de formation (nombreuses personnes présentes), ceux-ci sont familiarisés à la manipulation par un technicien avant le déroulement du TP. Ils sont isolés dans une pièce annexe et sont amenés dans la salle de TP au fur et à mesure des besoins.

Afin de réduire la douleur lors des actes chirurgicaux, des injections de solution de lidocaïne sont administrées sur les trajets des incisions avant ouverture. Les animaux reçoivent un complément d'anesthésie si des signes de réveils deviennent perceptibles (rétractation en pinçant avec l'ongle l'intérieur d'une des pattes postérieures).

- Remplacement :

Nous utilisons également une alternative à l'utilisation d'animaux vivants pour ces travaux pratiques, il s'agit du rat KOKEN. Le stagiaire peut ainsi apprendre les techniques de contention de l'animal, le gavage, l'injection dans la veine de la queue, la collecte du sang et l'intubation trachéale sur un rat

mannequin. Les techniques de sutures sont réalisées sur de la peau de cochon (couenne, oreille, pied) pour lesquelles nous n'utilisons pas d'animaux vivants.

- Réduction :

Le nombre de rongeurs utilisés est calculé au plus juste (un animal par binôme/trinôme de stagiaires) et la quantité est toujours adaptée au nombre de stagiaires.

**8938** Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France, comme dans l'Union européenne et aux États-Unis. Il représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. C'est une maladie complexe, il existe de nombreux sous types de tumeurs mammaires qui ont des profils histologiques, génétiques, génomiques variés expliquant une évolution clinique différente. C'est pourquoi, différents types de traitements peuvent être utilisés : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie, les thérapies ciblées ou une combinaison de ces traitements. Toutefois, avec 18,2 % des décès féminins par cancer, cette maladie reste la première cause de décès par cancer chez les femmes en 2012.

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 de réaliser des tests pré-cliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs composés thérapeutiques innovants les plus prometteurs. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales mammaires humaines à des souris immunodéficientes. En effet, la xénogreffe orthotopique de cellules de patientes constitue le modèle pré-clinique à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape pré-clinique.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle in vivo sera remplacé par des modèles in vitro. Nos études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des drogues sur le développement tumoral. Si nécessaire, des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 12) afin de s'assurer de leur bonne tolérance à ces molécules et d'adapter les doses à administrer à notre souche de souris. Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité sur au moins 2 modèles différents de xénogreffes mammaires. Pour mener ces tests d'efficacité, au maximum 4 groupes de 8 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé et un groupe contrôle positif recevant le traitement de référence en clinique de la tumeur greffée. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux et lorsque possible, ces groupes contrôles seront commun à plusieurs tests d'efficacité. De même, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse ou l'imagerie par bioluminescence. Les procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie. Enfin, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Pour ce projet qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 4 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 2220 souris.

**8939** Notre équipe étudie les mécanismes moléculaires et cellulaires qui influencent la vulnérabilité cellulaire à des changements de signalisation médiés par les Récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs). Nous avons généré des souris chez lesquelles l'expression d'un RTK (Met) est légèrement augmentée, conduisant ainsi à des tumeurs, de sous-type spécifique, au niveau du foie ou de la glande mammaire. Des analyses de marqueurs révèlent que ces souris correspondent à des sous-groupes de patients atteints soit de cancer du foie, soit de cancer du sein, soulignant leur intérêt clinique. Nous utilisons ces tumeurs pour réaliser différents criblages à grande échelle, conduisant ainsi à la découverte de gènes impliqués dans ces pathologies.

Ces modèles murins constituent un outil de choix pour :

1) apporter une meilleure compréhension dans la Biologie du Cancer, les étapes de formation et /ou de progression tumorale

2) identifier des nouveaux biomarqueurs pour affiner les diagnostics cliniques des patients

3) identifier des nouvelles thérapies moléculaires spécifiques à ces sous-groupes de patients

Nous avons aussi généré des souris déficientes en Glypican-4 (Gpc4), une molécule clé pour la perception par les cellules des signaux extracellulaires. Nos résultats montrent que la modulation de Gpc4 permet la manipulation de certains réseaux de signalisation afin d'augmenter le potentiel thérapeutique des cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSC) tout en minimisant les risques d'effets secondaires (par exemple la formation de tératomes). Ces souris constituent un outil pour élargir nos connaissances sur la perception des réseaux de signalisation cellulaire pendant le développement et sur l'homéostasie tissulaire.

Nos projets de recherche sont basés sur un large panel de modèles in vitro, complétés par les modèles murins (décrits ci-dessus, ainsi que souris sauvages et souris nude) nécessaires pour consolider et élargir les connaissances acquises in vitro dans un contexte physiologique. La qualité de notre plan expérimental, la réalisation d'expériences in vitro en amont des études chez la souris, ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés, prenant ainsi en considération la règle des 3R.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans aux vues des différentes ressources financières et humaines disponibles (3 chercheurs statutaires, 1 ITA, 3 chercheurs en stage post-doctoral, 2 étudiants en Thèse et des étudiants en Master). Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 2 chercheurs et 1 ITA (3 formations niveau 1 dont 2 en chirurgie), tous les étudiants en stage post-doctoral et en thèse suivent la formation de niveau 2. Par ailleurs, nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement possède un agrément propice à l'expérimentation animale. Ce projet utilisera 1290 souris (génétiquement modifiées ou "nude"). 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 environnemental des animaux sont contrôlés. Lorsque les animaux présentent des tumeurs, ils sont euthanasiés. Les tumeurs sont prélevées afin de réaliser les analyses moléculaires, biochimiques, histologiques et des tests biologiques.

**8940** L'ischémie reperfusion est une séquence rencontrée dans de nombreuses pathologies ou interventions chirurgicales dont la chirurgie réparatrice de l'aorte et la transplantation rénale. Elle est responsable de dysfonctions à long terme des organes. L'ischémie d'un organe correspond à la phase où l'organe est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriment et en oxygène. La reperfusion se traduit par une reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour de l'apport en nutriment et de l'oxygène. Néanmoins, l'apport soudain d'oxygène provoque un stress important dans la cellule pouvant aller jusqu'à la mort de cette dernière. Les débris cellulaires qui en résultent se propagent et engendrent des lésions sur l'organe en question. Des études préliminaires du laboratoire ont montré que la protéine S, connu pour être un facteur anticoagulant, peut se lier à des récepteurs, à la surface des cellules. Ce système est connu pour activer le nettoyage des organes à travers l'élimination des débris cellulaires. De plus, dans cette condition, l'angiogenèse qui se déclenche suite à l'ischémie de l'organe, entraîne la formation de nouveaux capillaires sanguins qui peuvent être non fonctionnels. Là aussi, la protéine S interviendrait dans ce mécanisme pour inhiber l'angiogenèse. Ainsi dans ce projet, nous voulons mettre en évidence le rôle protecteur de la protéine S et de son récepteur dans un modèle d'ischémie reperfusion rénale in vivo chez le rat. Pour cela, nous utiliserons des rats mâles de souche Royal College of Surgeon (RCS) non mutante (rdy+) et mutante (rdy-). Cette dernière a la particularité de posséder des mutations rendant non fonctionnel le récepteur de la protéine S. Nous utiliserons également dans ces conditions l'injection d'un agent neutralisant de la protéine S pour caractériser le rôle du récepteur à la protéine S et exclure un effet sur un autre récepteur potentiel. Le premier objectif de ce projet est d'étudier l'expression de la

protéine S et de son récepteur dans le rein après une ischémie reperfusion, grâce à la souche mutante, le deuxième objectif de ce projet est de mesurer l'implication de la protéine S et de son récepteur dans la récupération de la fonction rénale après ischémie reperfusion. Pour répondre à ces objectifs, une ischémie rénale bilatérale de 60 minutes sera réalisée chez ces animaux associée à une reperfusion de 24h et 7 jours où la fonction rénale sera évaluée et l'expression rénale de la protéine S et de son récepteur sera étudiée.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacer : Afin d'étudier la séquence d'ischémie-reperfusion, les méthodes d'études in vitro sont très limitées en raison de l'absence de vascularisation permanente de l'organe ou des cellules circulantes et de l'impossibilité d'étudier in vitro les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. Il est donc nécessaire d'évaluer les mécanismes impliqués dans le développement des lésions d'ischémie-reperfusion en utilisant un modèle animal.

Réduire : Pour ce projet de 3 ans, nous utiliserons les 2 souches de rats pour répondre aux deux objectifs de ce projet, ce qui nous donne un total 120 rats. Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour les analyses statistiques et découle d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part.

Raffiner : Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux, hébergés par 2, bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au maximum la douleur liée à la chirurgie.

**8941** L'arthrose est une maladie très fréquente qui touche les articulations, notamment les genoux, et qui est caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire, sans infection. Dans les articulations affectées, la surface du cartilage se fissure, s'effrite et finit par disparaître. Cela s'accompagne du développement d'excroissances osseuses (les « becs de perroquet ou ostéophytes »). L'ensemble de ces lésions est la cause de douleur chronique et conduit à un enraidissement des articulations qui nuit aux mouvements. Outre l'âge, l'obésité est un facteur associé à l'arthrose : l'obésité comporte un surpoids et donc une surcharge pour l'articulation du genou, mais de plus elle est souvent associée à un métabolisme anormal (diabétique) et un état d'inflammation à bas niveau dans tout le corps, aggravant la pathologie articulaire. La probabilité de développer l'arthrose est beaucoup plus importante pour un individu obèse que pour un individu non obèse. Aucun traitement médicamenteux efficace de l'arthrose n'est actuellement disponible car les mécanismes de survenue de cette maladie sont mal connus.

La restriction alimentaire, le jeûne et ses modèles alternatifs - tels que le régime diététique cétogène, riche en gras et protéines, mais très pauvre en glucides - ont par ailleurs démontré leur impact positif non seulement sur le métabolisme, mais aussi sur différentes pathologies dégénératives et inflammatoires. Le régime cétogène est en général bien toléré et il peut être envisagé, par exemple, dans le contexte du traitement de l'épilepsie chez les enfants. Plusieurs études suggèrent que le régime cétogène pourrait être bénéfique pour le tissu cartilagineux, en limitant sa dégradation dans des pathologies dégénératives et inflammatoires.

Notre étude a pour but de tester l'hypothèse que le régime cétogène pourrait être bénéfique pour des individus obèses et arthrosiques, et d'étudier l'effet du régime cétogène sur la progression de l'arthrose; l'analyse de l'impact de ce régime sur l'évolution du profil métabolique sera aussi poursuivie.

Nous utiliserons un modèle animal de souris obèse arthrosique déjà développé dans notre équipe. L'arthrose des genoux sera induite par chirurgie dans des souris obèses et diabétiques, qui seront après nourries avec un de trois régimes - normal, obésogène (riche en gras), ou cétogène (riche en gras et protéines mais pauvre en glucides) - pour une période de 8 semaines. Dans ce modèle d'arthrose, les souris déambulent très rapidement après la chirurgie et ne montrent aucun signe de stress. Un analgésique est administré avant, pendant et après l'opération, qui s'effectue sur des souris anesthésiées et avec tous les soins péri-opératoires nécessaires.

Dans plusieurs publications il est démontré que le régime cétogène est bien toléré par les souris. Nous analyserons la physiologie musculo-squelettique et le métabolisme des souris, avec des examens très peu invasifs sur l'animal vivant (prise de sang, test de fonctionnalité musculaire, densitométrie osseuse). Ainsi nous examinerons différents paramètres de l'articulation, des os, des

muscles et du métabolisme des souris, pour évaluer la progression de l'arthrose et du syndrome métabolique.

L'étude des processus dégénératifs à l'origine de l'arthrose associée à l'obésité ne peut se concevoir qu'à travers une analyse systémique globale, tant les liens entre métabolisme énergétique, musculaire et squelettique sont étroits.

L'analyse de la cinétique de la maladie arthrosique ne peut être réalisée :

- in vitro : car c'est l'interaction des tissus de l'articulation (cartilage, os, muscle) sous l'influence de facteurs systémiques, qui est étudiée ici. Des co-cultures cellulaires ne pourraient non plus nous donner ce genre d'information.

- chez l'Homme : car les prélèvements effectués le sont lors de mise en place de prothèse c'est-à-dire au stade le plus tardif d'évolution de la maladie.

Afin de mener à bien ce projet, 90 souris mâles matures sur le plan squelettique seront nécessaires. Ce nombre comprend les animaux pour effectuer les trois différents groupes soumis aux trois régimes alimentaires post-chirurgie, notamment le régime normal, obésogène et cétogène. Ce nombre ne peut-être plus diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique.

Le projet proposé se base sur les résultats d'études précédentes, menées ailleurs mais aussi dans notre équipe. Souvent, l'arthrose est induite dans un seul genou. Nous privilégions cette fois l'induction bilatérale sur les deux genoux des pattes postérieures, pour deux raisons : premièrement, cela nous permet d'obtenir le nombre de genoux arthrosiques nécessaire pour toutes nos analyses avec la moitié de souris; deuxièmement, cette situation reflète la condition des personnes obèses arthrosiques, où normalement l'arthrose atteint les deux genoux.

Lors de la réalisation de cette étude, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérés grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 3), dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

**8942** L'aloise feinte est un poisson migrateur en déclin sur le bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne. Les raisons de ce déclin observé ne sont pas connues et très peu d'études ont été menées sur cette espèce au niveau européen.

Si l'on fait un parallèle avec la grande alose, espèce qui coexiste sur le même bassin versant et qui est, elle aussi en déclin, il est fort probable que le recrutement, c'est-à-dire la production de jeunes, soit défaillant.

Les connaissances sur les jeunes stades (larves et juvéniles) sont quasiment inexistantes. Et ces connaissances sont essentielles pour comprendre le fonctionnement de la population et tenter d'identifier les facteurs pouvant avoir un effet négatif sur le recrutement.

Les études sur ces jeunes stades en milieu naturel pour acquérir des connaissances sur les habitats, les déplacements, le régime alimentaire, sont très compliquées du fait de la taille des cours d'eau.

La solution consiste à capturer des géniteurs dans le milieu naturel, à mettre au point une méthode de reproduction et à obtenir des larves. Cette approche a été expérimentée et mise au point sur la grande alose au début des années 2000. Elle a permis la mise en place d'un programme de réintroduction de la grande alose dans le bassin du Rhin.

L'objectif du projet soumis est donc de capturer des géniteurs d'aloise feinte, de les transporter dans un site expérimental et de tester une méthode de reproduction contrôlée pour produire des larves pour des expérimentations sur la biologie et l'écologie des larves et juvéniles.

Les géniteurs seront capturés dans une rivière, à la ligne, en employant une technique qui minimise les dommages au poisson (utilisation d'hameçons adaptés pour ne pas les blesser). Cette méthode est préférée à la pêche au filet, car dans un filet, le poisson pris s'abîme en perdant des écailles.

Les poissons capturés – le nombre maximal sera de 30 géniteurs - seront immédiatement placés dans une cuve de transport, après sexage dans un hamac rempli d'eau, avant d'être transportés sur le site d'expérimentation. Les poissons qui présenteront des signes de fragilité seront remis à l'eau.

La solution retenue et éprouvée chez la grande alose, est de récupérer les poissons individuellement dans la cuve de transport, en les faisant entrer dans un sac en plastique. Ils seront répartis dans 2 bacs de reproduction puis recevront alors l'injection d'hormones en intramusculaire au travers du sac, avant d'être immédiatement transportés dans le bac de reproduction.

La reproduction se déroulera spontanément dans le bac de reproduction, sans autre intervention. Ce bac sera couvert pour limiter les perturbations extérieures, avec un courant circulaire pour favoriser les conditions naturelles de nage, un niveau d'oxygène  $\geq 8\text{mg/l}$  et une température maintenue entre 18 et 20°C, conditions adaptées pour des géniteurs en situation de reproduction.

La stabulation des géniteurs sera de 72h maximum. Ils seront ensuite euthanasiés. Des mesures biométriques ainsi que des prélèvements seront réalisés.

Les œufs seront récupérés en sortie de bac dans un piège à œufs mis au point pour la grande alose et mis en incubation. Les larves obtenues seront élevées dans des auges jusqu'à l'âge de 10 jours maximum. Elles seront nourries avec des artémias vivants, distribués en continu pendant la phase éclairée.

Nous avons veillé au respect de la règle des " 3 R " :

- « R » de « Remplacement »

Pour tester la méthode de reproduction et produire des larves, il nous est impossible de remplacer ces poissons par d'autres objets d'étude.

- « R » de « Réduction »

Pour tenir compte de la variabilité du niveau de maturation des gonades des individus pris dans le milieu naturel, il est nécessaire de disposer d'un nombre suffisant de géniteurs. Ce nombre a été estimé à 30, au regard de l'expérience acquise sur la grande alose. Cet effectif de 30 est un maximum jugé suffisant pour atteindre notre objectif de reproduction.

- « R » de « Raffinement »

L'ensemble du protocole a été réfléchi pour limiter au maximum les manipulations sur des géniteurs extrêmement sensibles et fragiles, et de procurer aux poissons les conditions les plus favorables à leur transport ou à leur stabulation dans le bac de reproduction :

- la méthode de capture choisie est la moins dommageable pour les poissons ;

- la cuve de transport est circulaire et initialement conçue pour le transport des grandes aloses. L'eau est oxygénée, légèrement salée et animée d'un courant circulaire. La durée du transport sera d'une heure environ (choix du site de capture à proximité du lieu d'expérimentation).

- Le recours à l'anesthésie n'est pas retenu, car il nécessiterait d'anesthésier, en même temps, l'ensemble des poissons de la cuve de transport, ce qui impliquerait une anesthésie très longue pour les derniers poissons. L'anesthésie dans un bac séparé impliquerait une manipulation supplémentaire des poissons et allongerait considérablement le séjour des poissons dans la cuve de transport (milieu confiné, adapté au transport, mais pas à la stabulation).

- La reproduction est obtenue dans le bac de reproduction, sans autre intervention humaine ;

- pendant toute la durée de l'expérimentation, le poisson n'est jamais sorti de l'eau.

A la fin de la stabulation, les géniteurs ne peuvent pas être remis dans le milieu naturel car, ayant subi une injection hormonale, ils sont impropres à la consommation (risque de capture par un pêcheur). Il n'existe pas d'élevage de cette espèce, ni de structures d'élevage susceptibles d'accueillir ces poissons. Les géniteurs seront donc euthanasiés à la fin de la stabulation.

Les larves produites seront utilisées pour des expérimentations sur l'écologie et la biologie des larves et juvéniles. Ces expérimentations sont menées séparément par un autre porteur de projet et feront l'objet d'une saisine spécifique et distincte de celle-ci.

**8943** L'État de Stress Post-Traumatique (PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique à forte prévalence dans la population générale (8 – 12%) qui, en l'absence de prise en charge adaptée, peut se compliquer en formes handicapantes et comorbides (dépression, addictions, anxiété, etc.)

Le PTSD se développe à la suite du vécu d'un événement traumatisant pour la personne et va induire un certain nombre de symptômes comportementaux mais aussi cognitifs. On retrouve ainsi chez les patients un syndrome de reviviscence traumatique, un évitement des stimuli associés au traumatisme, une activation neurovégétative et enfin des troubles de l'humeur et de la cognition.

L'implication de l'hippocampe dans la vulnérabilité à cette pathologie a été bien documentée. Or, au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. On peut donc penser que ces néoneurones pourraient être impliqués dans la vulnérabilité à développer des symptômes de PTSD.

Pour une étude approfondie de cette pathologie et notamment de l'implication des néoneurones dans le développement de celle-ci, l'utilisation d'un modèle animal est nécessaires. Le modèle murin de PTSD le plus éthologique consiste en une exposition à un prédateur naturel, dans le cadre de notre étude des rats, qui ne seront pas hébergés dans notre animalerie, ne subiront aucune procédure et proviendront d'une autre animalerie. Ce protocole de conditionnement de peur provoque des modifications comportementales durables (évitement, immobilisation (peur), sursaut exagéré, anxiété accrue), associées à la symptomatologie et aux altérations neurobiologiques chez l'humain. Par ailleurs, chez l'animal il est possible d'induire expérimentalement de la neurogenèse. En effet une souche de souris transgéniques a été développé récemment, il est possible chez ces souris d'induire une augmentation de la neurogenèse à un moment voulu grâce à une injection de Tamoxifène activant la mutation génétique.

Le but de cette expérience est d'évaluer les effets d'une augmentation de la neurogenèse adulte sur la vulnérabilité au stress traumatique. Il s'agira d'évaluer la contribution de neurones âgés de 4 semaines, des résultats préliminaires ayant permis de mettre en évidence un effet sur certains symptômes dans un autre modèle PTSD. Pour cela, on testera tout d'abords 2 lots expérimentaux de souris transgéniques qui subiront ou non le stress traumatique. Cela dans le but de valider ce modèle de PTSD sur cette souche de souris. Puis si le modèle est validé, nous testerons 8 lots expérimentaux, qui se distingueront par 3 facteurs : le fait d'avoir ou non subi le stress traumatique, le fait d'exprimer ou non la mutation qui induit la neurogenèse, le fait d'avoir ou non subi l'administration de Tamoxifène (qui active la construction génétique). Ainsi, il y aura  $2 \times 18 = 36$  souris et  $8 \times 18 = 144$  souris soit un total de 180 souris. En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : le stress traumatique appliqué aux animaux peut être qualifié de moyen, en raison de sa brièveté. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement des cages d'hébergement est systématique (cabanes, tubes et smarthomes®).

Remplacement Ce modèle s'intéressant au comportement animal, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement (par exemple, une étude in vitro) n'est envisageable. Le stress chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire in vitro n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle ( $n=15$  sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

**8944** Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes, dont l'ataxie. Plusieurs cliniciens vont jusqu'à proposer que ces déficits moteurs peuvent être prédictifs des TSA surtout qu'ils semblent apparaître avant les troubles comportementaux et cognitifs. L'objectif du projet est d'utiliser un modèle animal transgénique de l'autisme (Shank3 : souris C57BL/6J), de caractériser leur activité motrice, qui n'a que peu été réalisé auparavant, et de disséquer les réseaux neuronaux impliqués dans ce trouble au niveau anatomique, électrophysiologique et neurochimique. Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent une étude horizontale allant de l'observation comportementale, à l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques sous-jacents. La souris, et plus spécifiquement celle de race C57BL/6J est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de cette espèce et de cette race ouvre la porte à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet

de recherche sur l'autisme. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système nerveux moteur proche de l'Homme. Les souris (*Mus musculus*) ont l'avantage d'être un modèle de choix pour les études comportementales.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

1) Remplacer : Le projet vise à caractériser les dysfonctionnements cognitifs et moteurs d'un modèle animal des TSA et à comprendre les mécanismes sous-jacents des déficits comportementaux observés. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire : (i) nous utiliserons des protocoles expérimentaux utilisés en routine dans le laboratoire qui ne nécessitent pas d'optimisation, (ii) nous utiliserons les mâles et les femelles pour notre étude et collecterons le maximum d'échantillons possible afin d'extraire le plus d'information par animal sacrifié, (iii) Un calcul de puissance statistique a été utilisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives.

3) Raffiner : Nous mettrons tout en œuvre réduire l'inconfort des animaux (Ex : habitude à l'expérimentateur, utilisation d'anesthésiques, euthanasie par dislocation cervicale) et (ii) nous utiliserons des tests comportementaux simples, ludiques et précédés d'une période d'acclimatation à l'environnement des tests.

Ainsi, et d'après nos estimations, nous aurons besoin de : 3 (groupes) x8 (animaux/groupes) x2 (sexes) x4 (procédures expérimentales) = 192. Nous émettons l'hypothèse que cette caractérisation peut ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles, et potentiellement identifier les réseaux neuronaux communs qui sous-tendent les troubles moteurs et cognitifs caractéristiques de ces pathologies.

**8945** Comprendre la connectivité fonctionnelle au cours d'un apprentissage au sein d'un réseau de neurones est un des enjeux majeurs du champ des neurosciences. Notre projet vise à étudier, la dynamique temporelle et spatiale dans laquelle les neurones s'activent au cours d'un apprentissage dans des conditions normales puis dans des conditions pathologiques.

Nous nous intéressons à un type d'épilepsie appelée épilepsie généralisée avec crises fébriles (GEFS+). Les patients présentant ce type d'épilepsie ont une mutation d'un gène impliqué dans le déclenchement de l'activité des neurones inhibiteurs de notre cerveau. Cette inhibition est essentielle dans le maintien de l'équilibre de la balance excitation/inhibition. Nos travaux précédents (article en préparation) ont montré dans un modèle de souris GEFS+ que la présence de la mutation ne suffisait pas pour induire des déficits cognitifs. L'induction de crises fébriles par hyperthermie sur ces souris mutantes pendant l'enfance déclenchaient des crises généralisées spontanées induisant à l'âge adulte des déficits cognitifs.

Il est à noter que l'hyperthermie induit de la même façon des crises épileptiques généralisées chez les patients au cours desquelles il y a perte de conscience et absence de douleur.

L'enregistrement EEG sur ces mêmes souris nous a permis de détecter des modifications des rythmes cérébraux affectant par conséquent la dynamique du réseau neuronale. De nos jours, il est communément admis dans la littérature que l'activité oscillatoire du cerveau joue un rôle important dans les fonctions cognitives. Les rythmes du cerveau sont des mécanismes fondamentaux pour moduler, filtrer et rediriger l'information dans le système nerveux central : les circuits neuronaux sont naturellement prédisposés à osciller selon une gamme de fréquence large.

Ces activités oscillatoires reflètent l'activité coordonnée d'une population neuronale. Nos données montrent des variations de ces rythmes à la surface du cortex. Cependant nous ne connaissons pas l'origine de ces modifications d'activités oscillatoires et identifier cette origine représente l'un des axes majeurs de ce projet.

Nous allons pour ce faire étudier l'activité neuronale unitaire au sein d'une population de neurones d'une structure spécifique (impliquée dans l'apprentissage et la mémoire) ou l'activité simultanée de plusieurs structures sur nos souris contrôles et modèle de la pathologie GEFS+.

Une fois les dysfonctionnements identifiés au sein de ce réseau nous pourrions envisager de modifier par stimulation ou inhibition la connectivité de ce réseau.

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



Remplacement : notre modèle de souris transgénique est le modèle le plus adéquat pour cette étude car il présente la même mutation que dans la pathologie humaine et présente le même phénotype épileptique et comportemental que les patients atteints de ce syndrome.

Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Ainsi l'activité neuronale sera enregistrée sur un même animal au cours de l'induction par hyperthermie des crises épileptiques et lors de l'apprentissage de deux types de tâches mnésiques. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu. Nous utiliserons 760 animaux pour ce projet.

Raffinement : Il est connu que les performances au cours des tests mnésiques dépendent du niveau de stress des animaux. C'est pourquoi nous portons une attention toute particulière aux conditions d'hébergement (animaux en groupes) et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur pour chaque procédure. Tous les actes chirurgicaux sont réalisés sous anesthésie générale avec la mise en place d'un protocole de prise en charge de la douleur per et post-opératoire par administration d'antalgiques. Les animaux sont par ailleurs suivis conformément à une grille d'analyse permettant notamment la mise en œuvre de points imités précoces et adaptés.

**8946** En Europe et dans le monde, l'utilisation de substances chimiques est soumise à diverses directives et règlements (directive produits phytosanitaires, règlements biocides et REACH...). Chaque substance doit faire l'objet d'une demande d'autorisation dans laquelle sont requis des tests d'écotoxicité tels que le test poisson selon la ligne directrice de l'OCDE 203 réalisé au laboratoire. Cette ligne directrice définit des recommandations d'essai afin d'évaluer les effets toxiques aiguës d'une substance chimique sur différentes espèces de poissons, *Danio rerio* étant la plus souvent utilisée. Réalisé en 2 étapes, il emploie un minimum de 72 individus (l'expérience du laboratoire peut dans certains cas permettre de ne réaliser qu'une seule étape et donc de diminuer le nombre d'individus testés). De même, une équipe d'experts écotox en charge des dossiers réglementaires réalise des recherches bibliographiques afin de vérifier la disponibilité de données de toxicité qui permettrait d'annuler le test dans son intégralité.

Nous envisageons la réalisation annuelle de 5 tests standards soit un total de 1800 poissons sur la durée du projet. A la fin du test (96h), tous les individus survivants sont euthanasiés. Cependant dans le cadre des 3 R, nous nous gardons la possibilité de réutiliser les lots témoins pour des essais préliminaires.

Le remplacement n'est pas possible car la réglementation impose un test sur poisson, les modélisations n'étant pas acceptées. Le nombre d'animaux utilisés par test est également cadré par la ligne directrice OCDE203. Néanmoins, dans le cas où une absence de toxicité serait révélée lors de la première étape du test préliminaire, la seconde étape sera réalisée selon les conditions d'un test dit "limite" qui emploie un nombre réduit d'individus. L'enrichissement des aquariums n'est pas possible car il faut éviter les interactions avec la substance chimique à tester. Les aquariums de stabulation disposent sur une face extérieure d'un poster d'ornement. Tous les aquariums sont situés dans un laboratoire dédié, au calme; les paramètres environnementaux sont contrôlés.

Note : ce test fait également partie du "package" de tests d'écotoxicité aquatique exigé dans le but de définir la classification et l'étiquetage de toute substance chimique.

**8947** Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 32% des décès dans le monde. La maladie des vaisseaux qui desservent le muscle cardiaque ou myocarde, les artères coronaires, représente la moitié des décès d'origine cardiovasculaire.

Elle se caractérise par un dépôt de lipides dans la paroi de ces artères, qui peut conduire, par obstacle à l'écoulement normal du flux sanguin, à l'angine de poitrine, voire à l'infarctus du myocarde.

Cette atteinte des coronaires est aujourd'hui bien connue. Cependant celles-ci en se ramifiant pour irriguer le myocarde, se divisent en vaisseaux de plus en plus petits. Il s'agit de microvaisseaux, que l'on ne sait pas bien explorer par les techniques actuelles.

Des données récentes suggèrent qu'une atteinte de ces microvaisseaux précéderait l'atteinte des plus gros dans l'histoire de la maladie coronaire. On devine alors l'intérêt de techniques qui

permettraient de quantifier l'atteinte de ces microvaisseaux, en terme de prévention du risque cardiovasculaire, de mise en place de traitements avant la survenue d'une maladie plus sévère.

Une technique de calcul de cette atteinte en tomographie par émission monophotonique (TEMP), une imagerie courante en cardiologie, a été mise au point à partir d'images obtenues lors d'examen habituels passés par des patients. On a pu montrer que les malades qui présentaient une atteinte des microvaisseaux (hétérogénéité de perfusion) détectée par cette technique avaient plus de chance de présenter un événement cardiovasculaire tel qu'un infarctus du myocarde par exemple.

Les mécanismes de l'atteinte des microvaisseaux sont cependant mal connus à l'échelle microscopique. Ce projet a pour objectif de clarifier ces mécanismes conduisant à l'apparition d'anomalies de la microcirculation visualisées en TEMP sur un modèle de rat diabétique. Nous proposons ici d'étudier les conditions influençant le développement précoce de la dysfonction coronaire microvasculaire, autorisant une meilleure interprétation des variations cliniques de l'hétérogénéité de la perfusion myocardique ainsi que, l'évaluation de l'efficacité d'un traitement anti-diabétique ayant également des effets cardiovasculaires bénéfiques (Liraglutide).

La mesure d'altérations du fonctionnement normal de l'organisme (dit physiologique) au cours d'un processus anormal pathologique (le diabète, ici) rend nécessaire l'utilisation d'un modèle animal. Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Au total 46 rats seront utilisés. Il s'agit du minimum d'animaux nécessaire afin de pouvoir obtenir des résultats exploitables durant le protocole prévu. Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R en tenant compte du fait qu'aucune méthode alternative n'est disponible pour le Remplacement. Les animaux seront hébergés par deux, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis bi-quotidiennement afin de contrôler leur bien être. L'utilisation de Streptozotocine associée ou non à un régime alimentaire particulier enrichi en lipides mis en œuvre dans cette étude entraînera un ralentissement de prise de poids voire une perte de poids. La mise en place de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance de ces animaux. Les injections seront réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires.

**8948** Le cancer du sein métastatique est la cause majeure de mortalité chez les femmes. Les métastases cérébrales sont les localisations les plus graves : les agents thérapeutiques ciblant les cancers du sein atteignent difficilement le cerveau protégé par sa barrière « hémato-encéphalique » ou, s'ils l'atteignent, n'y sont pas suffisamment concentrés. Les métastases cérébrales sont particulièrement fréquentes dans deux types histologiques de cancers du sein : les cancers du sein dits triples négatifs et les cancers du sein sur-exprimant la protéine HER2. HER2 (human epidermal growth factor 2) est un récepteur membranaire qui ; s'il est exprimé à la surface des cellules cancéreuses ; représente un facteur de mauvais pronostic. Les métastases cérébrales sont responsables du décès de 50% des patientes ayant un cancer du sein HER2.

Le trastuzumab est un traitement de référence pour la prise en charge des cancers du sein HER2. Cependant, bien que ce traitement permette de réduire la progression tumorale dans 80 % des cas pour des métastases situées en dehors du système nerveux central, cet agent thérapeutique ne peut pas passer la barrière hémato-encéphalique suffisamment rapidement ni d'atteindre des concentrations suffisantes pour induire une régression tumorale des métastases cérébrales.

L'administration de molécules thérapeutiques directement dans le liquide céphalorachidien, (administration intrathécale) a été développée pour pallier cette incapacité des agents à passer la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs rapports montrent par exemple, que l'injection intrathécale de trastuzumab a un effet bénéfique dans le traitement des métastases des cancers du sein HER2. Cependant, nous avons aussi mis en évidence une élimination rapide du trastuzumab du cerveau, due notamment à l'une des briques protéiques qui compose la barrière hémato-encéphalique (fragment Fc).

Notre projet consiste donc à développer un nouvel agent thérapeutique, dérivé du trastuzumab dépourvu du fragment Fc (fragment Fab). L'objectif de l'expérimentation proposée doit permettre de valider que le nouvel agent thérapeutique dépourvu de partie Fc est éliminé moins rapidement du cerveau que le trastuzumab. Pour cela, une comparaison entre la cinétique du Trastuzumab et du nouvel agent thérapeutique sera réalisée sur des rats. Afin de valider ces résultats deux composés thérapeutiques de référence (le bevacizumab et le ranabizumab) seront testés en parallèle afin de

valider les expérimentations. Un cathéter intrathécal sera posé chez des rats pour tester ces 4 composés thérapeutiques (212 au total). Les molécules thérapeutiques seront injectées dans le liquide céphalo rachidien (LCR) par ce cathéter, puis une ponction de LCR sera réalisée afin de mesurer la concentration de médicament au niveau cérébral à différents temps de cinétiques (10 temps au total) et apporter la preuve du concept proposé. Un dosage plasmatique des molécules thérapeutiques injectées sera également réalisé pour chaque temps de cinétique.

Cette expérimentation répond néanmoins aux exigences en termes de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, une étude systématique de l'ensemble des organes en tissu fixé (histologie, immunohistochimie), congélation (extraction d'acides nucléiques et protéiques) et microscopie électronique permet de réduire le nombre d'animaux étudiés. Bien qu'il existe des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique, que nous utiliserons d'ailleurs dans le cadre de ce projet, l'utilisation des animaux reste indispensable pour les tests pharmacologiques avant le transfert à l'homme. En effet, notre projet a des ambitions de transfert au patient, en recherche clinique, dès lors que nous aurons fait la preuve du concept de l'efficacité du fragment Fab dans le traitement des métastases cérébrales du cancer du sein HER2.

Tout sera fait pour favoriser le bien être des animaux pendant l'élevage, mais aussi et surtout pendant les actes chirurgicaux (pose de cathéter, prélèvement de LCR) ou les animaux seront anesthésiés pour limiter stress et douleur.

**8949** Le processus de réparation spontané et naturel du tissu osseux n'est pas assuré lors d'un traumatisme trop étendu, ou d'un prélèvement sur une grande surface d'os après l'extraction d'une tumeur osseuse par exemple. Dans ces situations, l'autogreffe osseuse est le traitement de référence mais présente des inconvénients, notamment de morbidité du site de prélèvement et de quantité disponible.

L'ingénierie tissulaire osseuse se développe depuis plusieurs années afin d'offrir une alternative à l'autogreffe osseuse en associant des biomatériaux à des cellules souches d'origine humaine capables de former de l'os et de promouvoir la revascularisation du site afin de régénérer le tissu osseux. La principale limitation de cette approche est que les cellules implantées ne survivent pas suffisamment longtemps pour induire le nouveau tissu en quantité suffisante pour combler le défaut osseux. Cette mortalité serait due aux conditions ischémiques (manque d'oxygène et de nutriments) subies par les cellules après implantation jusqu'à la vascularisation de l'implant. D'ailleurs, et de manière surprenante, le manque de glucose (et non d'oxygène) entraînerait la mort massive et rapide des cellules après implantation. Des expérimentations précédentes ont démontré qu'apporter du glucose aux cellules augmentait significativement leur survie dans des modèles *in vitro*.

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'effet bénéfique d'hydrogels nutritifs, capables de libérer en continu du glucose, sur la viabilité et la fonctionnalité (potentiels à induire des vaisseaux sanguins et à induire de l'os) des cellules souches ostéoprogénitrices. En effet, les modèles exclusivement *in vitro* ne permettent pas de prédire de façon fiable et précise la survie des cellules en ischémie car divers paramètres interviennent (tel que l'inflammation) et encore moins de prédire la néovascularisation (formation de vaisseaux sanguins) et néoformation osseuse (formation d'os), car tous ces processus font appel à plusieurs types cellulaires.

Trois études successives, utilisant différentes compositions d'hydrogels nutritifs, sont prévues pour évaluer les paramètres suivants : (i) viabilité des cellules implantées, (ii) potentiel des cellules à induire des vaisseaux sanguins, (iii) potentiel des cellules à induire de l'os. (i) Un modèle d'implantation sous-cutanée chez la souris sera utilisé pour évaluer la viabilité des cellules implantées par imagerie en bioluminescence, une technique non invasive, permettant un suivi longitudinal sur le même animal. (ii) Une étude cinétique, utilisant le même modèle, sera effectuée pour suivre la formation de vaisseaux sanguins autour des hydrogels. (iii) L'évaluation longitudinale de la formation osseuse induite par les cellules des hydrogels sera effectuée par imagerie rayons X, une technique non invasive. A la fin de chaque procédure, les hydrogels seront explantés pour des analyses histologiques afin de compléter/approfondir les résultats. L'ensemble du projet d'une durée de 5 ans, nécessite l'utilisation de 193 souris Nude, souris immunodéprimées pouvant recevoir des cellules d'origine humaine, permettant ainsi d'éviter les rejets et rendant possible l'évaluation de leur potentiel.

Afin de réduire le nombre d'animaux, 2 ou 4 hydrogels seront implantés par animal. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasive permettant un suivi longitudinal d'un même animal seront utilisées pour suivre la viabilité des implants cellularisés et leur potentiel à former de l'os. Enfin, les études cinétiques de formation de vaisseaux sanguins et de formation osseuse n'incluront pas les hydrogels à l'intérieur desquels les cellules ont montré une survie nulle 24 heures après implantation. Une période d'acclimatation d'une semaine avant l'entrée dans le protocole est accordée aux animaux. Une analgésie sera effectuée en pré- et post-opératoire suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin des procédures respectives. Des points critiques précis seront surveillés permettant d'objectiver la douleur ou la gêne (grille scorée). Au cas où des douleurs ou souffrances persistent en dépit des traitements entrepris, la décision d'euthanasie sera prise selon des critères préétablis. Afin de favoriser l'environnement social, les animaux seront hébergés par groupe de 3 dans les conditions standards de l'animalerie; eau et nourriture ad libitum ; température entre 20 et 22°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Chaque cage sera identifiée, et les souris resteront dans la même cage du début à la fin du protocole. Enfin, un environnement enrichi et adapté sera fourni, contribuant entre autre à l'usure des dents et au foussement des animaux.

La validation de l'efficacité thérapeutique des hydrogels nutritifs cellularisés chez la souris en site non-osseux permettra d'exploiter par la suite ces résultats en site osseux, c'est-à-dire dans des grandes pertes de substances osseuses, après sélection (donc diminution) des groupes d'hydrogels ayant donné des résultats satisfaisants au cours de ces études. Les résultats contribueront à plus long terme à la mise au point de traitements des grandes pertes de substance osseuse chez l'homme.

**8950** En élevage, l'alimentation est un facteur essentiel pour assurer une bonne qualité de production mais aussi une bonne santé des animaux et par conséquent leur bien être.

L'apport énergétique à la base de l'alimentation doit être complété par un apport en oligo-éléments qui sont essentiels aux grandes fonctions du vivant. Parmi les éléments essentiels, le zinc joue un rôle majeur dans la synthèse de protéines, la croissance microbienne (mise en place de la flore intestinale), l'immunité, l'œstrus et la fertilité, la signalisation hormonale, la transcription (protéines à doigts de zinc), par exemple.

De manière générale, les suppléments en Zinc sont quasi systématiques et sont constituées par des sources inorganiques dont la biodisponibilité est faible pour deux raisons : 1- ces sources inorganiques ont une forte capacité à se lier à certains composants de l'aliment les rendant insolubles ; 2- le mode d'absorption bien que mal connu semble être peu efficace. En conséquence, des doses importantes de zinc sont utilisées en supplémentation avec une efficacité limitée et se retrouvent relarguées dans l'environnement.

Il convient donc d'améliorer la biodisponibilité des sources de Zinc par l'utilisation notamment de sources organiques dont l'absorption est a priori meilleure.

Pour valider cette hypothèse chez les équins et promouvoir l'utilisation de sources de Zinc organiques, deux lots homogènes de 10 ponettes seront mis en expérimentation dans cette étude. Durant 2 mois les animaux ne recevront plus de supplémentation en Zinc et auront une ration de base très pauvre en Zinc (paille + foin). Par expérience, nous savons qu'aucune conséquence physiologique ne sera induite par cette courte période de carence en Zinc. A l'issue de ces deux mois, deux sources de zinc seront testées et administrées par voie orale. Un groupe recevra une source organique de Zinc et un lot une source inorganique. De manière à étudier la vitesse d'absorption du Zinc, des prises de sang sériées seront réalisées durant les 24h qui suivent la supplémentation pour suivre la quantité de Zinc absorbée au cours du temps.

Remplacement : l'absorption intestinale du zinc ne peut pas être étudiée in vitro.

Réduction : au regard de données publiées avec d'autres sources de zinc, deux groupes de 10 ponettes devrait permettre d'obtenir une puissance statistique de 88% avec un test Mann & Whitney, considérant un seuil de risque alpha de 0.05.

Raffinement : les ponettes seront logées en stabulation, elles auront tout au long du protocole des brosses à disposition, des blocs à lécher de sel pur et de la paille ad libitum sur sol.

**8951** L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie progressive qui se définit par une élévation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, évoluant vers une défaillance

cardiaque droite puis au décès du patient. Outre la transplantation pulmonaire, dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. L'HTAP se manifeste par des signes apparemment bénins, comme l'essoufflement à l'effort, mais responsables d'un diagnostic tardif et d'un pronostic grave : en l'absence de traitement, l'espérance de vie n'atteint en moyenne que 2,8 ans après diagnostic. Bien que les mécanismes physiopathologiques restent encore à découvrir, il est connu que des anomalies touchant les fonctions des cellules endothéliales des petits vaisseaux pulmonaires vont être responsables de la réduction progressive de la lumière vasculaire, empêchant ainsi le bon écoulement sanguin et favorisant le développement et la progression de la maladie. Afin d'identifier et de mieux comprendre ces anomalies qui touchent les cellules endothéliales pulmonaires dans l'HTAP, nous souhaitons étudier le rôle de la dérégulation de l'activation des récepteurs aux minéralocorticoïdes (mineralocorticoid receptors ou MR) dans la mise en place de la maladie et de déterminer si l'activation du MR pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique.

En effet, nos données d'études *in vitro* montrent un défaut d'activation des MR dans les cellules provenant de patients atteints d'HTAP.

Cette maladie est complexe et fait intervenir plusieurs types cellulaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, péricytes et cellules immunitaires. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces types cellulaires provenant de patients atteints de cette maladie, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique et pathologique. Les modèles animaux d'HTAP sont alors des outils très importants et permettent le suivi de la mise en place dans le temps des différents mécanismes physiopathologiques et d'avoir donc accès aux phases précoces de la maladie. Les modèles animaux, régulièrement utilisés dans de nombreuses publications de différentes équipes de recherche, sont un réel apport et un outil indispensable pour nos travaux de recherche.

Nous souhaitons évaluer le rôle de la dysfonction endothéliale et la contribution des MR dans le modèle monocrotaline, puis traiter l'HTAP induite à l'aide d'un inhibiteur spécifique des MR. Ce modèle fait intervenir des modifications fonctionnelles, structurelles et moléculaires du lit vasculaire pulmonaire et du ventricule droit. Les contraintes observées chez l'animal ne seront pas plus sévères que les signes bénins retrouvés chez l'homme puisque l'étude se réalise dans les phases précoces de l'HTAP. Nous évaluerons plusieurs doses médicamenteuses seules et combinées avec les traitements palliatifs utilisés chez le patient. Nous visons à réduire au minimum le nombre de rats utilisés afin d'obtenir des données statistiquement exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Durant les expérimentations, les animaux seront quotidiennement observés et évalués au moyen d'un score (apparence, poids et comportement) pour s'assurer de leur bien être. Nous envisageons donc pour cette étude d'utiliser 240 rats WISTAR sur une durée de 5 ans.

**8952** Compte tenu des souffrances liées à la castration chirurgicale des porcelets mâles, la filière porcine européenne s'est engagée dans une démarche d'abandon de cette pratique d'ici 2018. Une des alternatives proposées est l'élevage de mâles entiers. Cependant, l'élevage de mâles entiers soulève des inquiétudes concernant la qualité de la viande, liée à la présence de défauts d'odeurs (= odeurs sexuelles).

La sélection contre l'apparition de ces odeurs est possible mais, avant d'être mise en œuvre, il est nécessaire d'estimer les conséquences d'une telle sélection sur l'aptitude à la reproduction des truies. En effet, l'apparition de ces défauts d'odeur est inextricablement liée au développement pubertaire des mâles, et sans doute également des truies. L'objectif de ce projet est de contribuer à mieux comprendre le déterminisme génétique des odeurs sexuelles en lien avec le développement pubertaire des truies et d'une manière générale l'aptitude à la reproduction. Ces connaissances permettront de proposer des objectifs de sélection équilibrés afin d'améliorer simultanément le bien être des animaux, la qualité de la viande et la durabilité de l'élevage porcin.

Au total, 1000 mâles entiers seront mis en expérience. Les mesures sur animal vivant concerneront le développement pubertaire (prises de sang, prises de salive), par des mesures d'hormones. La concentration des molécules directement impliquées dans l'apparition des odeurs sexuelles dans le tissu gras est mesurée dans le gras, après abattage des animaux. L'aptitude à la reproduction des

truies est quant-à-elle mesurée chez des cochettes apparentées, présentes dans les élevages de sélection.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : le porc est l'espèce cible du projet; sachant qu'il s'agit de déterminer un défaut de qualité de la viande spécifique du porc, des mesures directes sur les animaux sont indispensables pour répondre à la problématique. Réduction : le nombre d'individus a été calibré au minimum pour estimer les paramètres génétiques des caractères étudiés et permettre une évaluation génomique avec une précision suffisante pour assurer à terme une sélection efficace. Raffinement : la procédure de prise de sang sera réalisée par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité et des méthodes de prélèvement alternatives sont intégrées au projet pour proposer, à l'issue du projet, des méthodes de phénotypage non invasives.

**8953** Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions des cellules immunitaires ont permis l'émergence de nouvelles immunothérapies anti-tumorales. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers, y compris le cancer du poumon et le cancer de la peau. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité du fait des mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. L'objectif de ce projet consiste à élucider le rôle anti-tumoral de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs in vivo dans un modèle de souris greffées avec des lignées tumorales. Notre programme vise à potentialiser les immunothérapies anti-cancéreuses actuelles en optimisant le recrutement des globules blancs dans les tumeurs.

Ce travail prévoit donc d'utiliser un modèle murin afin d'étudier le rôle de l'intégrine CD103 dans la potentialisation de la réponse immunitaire antitumorale. Plus particulièrement, nous voulons étudier le rôle de CD103 sur la population immunitaire de cellules T CD8+. Pour cela, nous réaliserons des expériences de réponse antitumorale dans des souris transgéniques knock-out pour le gène CD8 (CD8-KO). Ces souris sont dépourvues de cellules immunitaires T CD8+. Des cellules T CD8+ provenant de souris C57Bl/6 sauvage (WT) ou de souris knock-out pour le gène CD103 (CD103-KO) seront transférées dans les souris CD8-KO afin de réintroduire des cellules T CD8+ WT ou KO pour l'intégrine CD103. Concernant le protocole expérimental, ces souris CD8-KO, transférées avec des cellules CD8+ CD103 WT ou CD8+CD103-KO, seront ensuite greffées en sous-cutanée avec une lignée tumorale puis vaccinées dès l'apparition de tumeurs avec un vaccin composé d'un peptide et d'un adjuvant. La progression tumorale ainsi que la réponse immunitaire globale seront caractérisés. Nous pourrons ainsi analyser l'impact antitumoral de l'intégrine CD103 sur des cellules T CD8+. La contrainte maximale pour les souris sera celle de petites tumeurs en sous-cutanée (taille limitée et surveillée).

L'utilisation des souris est indispensable dans ce projet, car elle seule permet d'étudier l'impact des cellules immunitaires résidentes dans un microenvironnement tumoral complexe, vascularisé et connecté via les systèmes vasculaires à la réponse immunitaire et aux effecteurs humoraux.

Pour cela nous utiliserons 100 souris CD8-KO sur 2 ans. Les expérimentations in vivo seront réalisées toutes les 5 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenus afin de réduire le nombre d'expériences. Les souris seront suivies quotidiennement pour vérifier leur bien être, suivant les règles en vigueur à l'animalerie, ainsi que pour vérifier que les souris n'arrivent pas aux points limites. Les tumeurs seront suivies et mesurées tous les 2 jours. A la fin des expériences, plusieurs paramètres seront analysés dont l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs. Ces paramètres permettront de définir le succès de l'hypothèse de départ sur le rôle de cellules positives pour les CD8 et CD103.

**8954** Plusieurs milliers de femmes souffrent d'infertilité due à l'absence d'utérus congénitale ou acquise. Pour ces femmes désireuses d'une grossesse, la transplantation utérine pourrait devenir une piste thérapeutique. En effet, cette intervention réalisée à partir de donneuses vivantes apparentées a permis la naissance de 8 enfants bien portants en Suède sur 9 greffes. Mais des limites techniques demeurent, en particulier celles portant sur la dissection des veines utérines de petit calibre qui nécessitent de longues heures d'interventions avec une morbidité non négligeable pour la donneuse

ainsi que celles portant sur les connexions vasculaires liées également au petit calibre des vaisseaux. Ces difficultés rendent actuellement la greffe utérine extrêmement complexe, réservée à des protocoles de recherche et des équipes entraînées.

Afin de définir des protocoles d'intervention, des études ont été menées sur un modèle animal. La brebis apparaît comme le modèle le plus pertinent de par sa taille et sa vascularisation utérine similaires à celle de la femme.

Nous avons mené une étude préliminaire de faisabilité sur 5 brebis avec autogreffe (c'est à dire retrait puis greffe de l'utérus sur le même animal). Ces premières chirurgies nous ont permis de mettre en place un protocole chirurgical dont les difficultés principales ont concerné les connexions de vaisseaux de petit calibre (2 veines utéro-ovariennes et 2 artères utérines).

Dans cette deuxième phase du projet, notre objectif est d'évaluer la faisabilité de la greffe utérine avec une seule veine utéro-ovarienne au lieu de deux. En effet, si 2 artères utérines sont nécessaires à la survie du greffon, l'utilisation d'une seule veine utéro-ovarienne au lieu de deux pourrait simplifier le geste opératoire tout en représentant un drainage veineux potentiellement suffisant pour l'utérus. Ces éléments pourraient nous aider à comprendre les modalités du drainage veineux de l'utérus chez un modèle ovin proche du modèle humain.

Par ailleurs, notre étude préliminaire portant sur seulement 5 brebis ne nous a pas permis de constituer un groupe "contrôle" solide.

Nous étudierons donc deux protocoles :

1 protocole A en autogreffe utérine de 10 brebis qui serviront de groupe "contrôle".

1 protocole B en autogreffe utérine de 10 brebis avec une seule veine utéro-ovarienne.

Le nombre nécessaire de brebis dans chaque protocole est évalué à 10 : en raison du taux d'échec estimé entre 20 et 30%, le nombre minimal de 10 brebis par groupe est nécessaire pour l'obtention de résultats exploitables.

Les brebis seront maintenues dans l'unité expérimentale (bergerie) en conditions d'élevage traditionnel et en groupe jusqu'à la veille de l'intervention chirurgicale. L'environnement sera enrichi avec des pierres de sel. Le soir précédant l'opération, les brebis concernées seront mises à jeun dans une case individuelle, à proximité visuelle et olfactive des autres individus. Le jour de l'opération, avant l'anesthésie, les brebis recevront un traitement anti-douleur pour éviter toute souffrance. Les animaux seront euthanasiés à l'issue de l'intervention chirurgicale sans avoir été réveillés. La qualité fonctionnelle du greffon sera évaluée au décours de la greffe par l'analyse de marqueurs cliniques (coloration de l'utérus, perméabilité des anastomoses vasculaires), biologiques (gaz du sang) et des techniques d'imagerie non invasives (échographie Doppler).

**8955** Les troubles du développement sexuel (TDS) constituent un groupe important de maladies humaines avec plus d'un enfant sur 300 ayant des symptômes tels que les cryptorchidies et un sur 4000 présentant une inversion de sexe. Cependant les TDS restent inexplicables dans plus de 50% des cas. Cela est dû au fait que les bases cellulaires du développement/maintien des gonades et les voies moléculaires impliquées dans la spécification des lignées cellulaires de la gonade restent à clarifier. Dans ce projet, nous utiliserons des approches de traçage des lignages cellulaires grâce à des modèles de souris uniques pour analyser les bases de la différenciation sexuelle de la gonade. La compréhension des mécanismes de développement et d'homéostasie de la gonade est une priorité pour pouvoir ensuite identifier les causes des TDS.

La détermination du sexe est un processus de développement unique par lequel un organe précurseur, la gonade bipotentielle peut donner lieu à deux organes adultes complètement différents, le testicule ou l'ovaire contenant différents types de cellules. Les 3 populations majoritaires sont les cellules de support de la gamétogenèse, les cellules stéroïdogènes et les cellules germinales. Cependant, on sait peu de choses sur les mécanismes moléculaires qui permettent la formation de lignées cellulaires de la gonade. Nos travaux précédents ont révélé que les cellules progénitrices de la gonade bipotentielle, montrent une hétérogénéité moléculaire et expriment des marqueurs distincts. Ces différences moléculaires sont susceptibles de se traduire par des voies de différenciation distinctes et nous émettons l'hypothèse qu'elles pourraient être à l'origine de la diversité des cellules gonadiques. Pour tester notre hypothèse, nous allons utiliser une combinaison de gènes rapporteurs pour effectuer des études de suivi de lignage et déterminer le devenir de ces

progéniteurs. Cette approche nous permettra d'identifier les cellules provenant de différentes populations de cellules progénitrices. Cette étude approfondira nos connaissances sur les bases moléculaires de l'hétérogénéité cellulaire dans la gonade, condition préalable pour comprendre comment des réseaux génétiques distincts déterminent la spécification des cellules testiculaires et ovariennes. Après le développement ces cellules progénitrices/souches restent nécessaires au maintien de ces organes. Nous étudierons si elle participe au renouvellement cellulaire de la gonade adulte.

Dans un souci de se conformer à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), des techniques de culture de gonades ont été testées mais ont donné des résultats non conclusifs dus à des problèmes de dégénérescence des tissus. Ainsi, ces analyses doivent être réalisées sur des gonades in vivo en utilisant des souris génétiquement modifiées. Cependant si de nouvelles conditions de culture deviennent utilisables, nous les utiliserons dans la perspective de remplacement. Les modèles murins creERT2 n'ont pas de phénotype dommageable. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. En ce qui concerne le raffinement, les souris recevront un traitement en injection intra-péritonéal (i.p.) ou gavage oral. Les traitements utilisés ont déjà été expérimentés chez la souris. Le protocole a été établi pour allier traitement et minimisation des effets secondaires potentiels. L'injection i.p. peut engendrer une douleur légère. Les souris seront surveillées suivant des grilles d'évaluations afin de leur éviter toute souffrance grâce à des points limites adaptés et précoces qui ont été déterminés en accord avec la réglementation européenne. Les protocoles utilisés ont été soigneusement choisis afin de réduire au maximum le nombre et l'ampleur des interventions pratiquées sur les animaux sans en compromettre l'efficacité. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 1380 souris. Certains TDS résultent de défauts de différenciation d'une de ces populations de cellules. Ce projet permettra de comprendre comment les cellules acquièrent leur identité, ce qui est une première étape pour avancer dans l'étiologie de ces pathologies.

**8956** Ce projet innovant vise à découvrir de nouveaux rôles d'une protéine clé impliquée dans la maladie d'Alzheimer (MA), la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). Nous savons que le dysfonctionnement de l'APP affecte la mémoire des patients malades mais la fonction de cette protéine est peu connue. Au cours de la dernière décennie, il a été suggéré un déséquilibre des systèmes de communication entre les neurones du cerveau. Nous chercherons quel rôle peut jouer l'APP dans la communication inhibitrice entre les neurones. Nous postulons que la perturbation des fonctions de l'APP dans la communication inhibitrice contribue à la pathologie de la MA. Ce projet permettra donc de mieux comprendre la maladie et à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. La réalisation du projet est basée sur la modification génétique des neurones étudiés dans leur tissu natif (tranches de cerveau de souris), c'est-à-dire dans un contexte physiologique. Nous supprimerons le gène encodant la protéine APP dans les neurones étudiés avant d'analyser si la communication inhibitrice entre les neurones est perturbée par l'absence d'APP. Ces modifications génétiques seront réalisées grâce à l'utilisation de ciseaux moléculaires injectés dans les neurones du cerveau afin d'enlever ou de remplacer le gène encodant pour l'APP. Ces injections cérébrales auront lieu sur des souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxique ». Nous utiliserons la lignée de souris APP/APLP2dkoc qui n'a pas de phénotype dommageable. Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique permettra d'injecter cette lignée de souris qui seront par la suite utilisées au cours d'expériences d'enregistrement de l'activité des neurones (électrophysiologie) ou des expériences d'imagerie cellulaire et moléculaire.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie ou d'imagerie afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (Réduction). (2) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés. Tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaine en local et buprenorphine en sous-cutanée) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise



en place d'une réhydratation et d'un réchauffement. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. (Raffinement). (3) Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein de réseau de neurones. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère dont le génome est facilement modifiable.

880 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer.

**8957** Chez l'homme, le cancer de la prostate est la première cause de morbidité et la troisième cause de mortalité par cancer. Les traitements de référence comme la radiothérapie induisent des effets indésirables comme l'incontinence ou l'impuissance pour une efficacité limitée. L'utilisation de traitements thermiques ciblés est une voie prometteuse pour augmenter l'efficacité et diminuer la toxicité des traitements conventionnels du cancer de la prostate. Différentes sources d'énergie thermique (Ultrasons Focalisés de Haute Intensité, Cryothérapie, Lasers, ...) ont déjà été proposées pour cette indication. Néanmoins, la diffusion de ces énergies a encore un impact négatif à l'origine d'effets secondaires. Une nouvelle approche propose d'utiliser différentes sources d'énergie (champ magnétique alternatif, ultrasons à basse fréquence, laser 808nm) pour induire un effet thermique local et modéré potentialisé par l'accumulation de nanoparticules d'oxyde de fer dans la tumeur. L'utilisation des nanoparticules montre un potentiel grandissant comme outils de diagnostic, pour traiter des pathologies comme l'anémie mais aussi dans le traitement de certains cancers. Plusieurs traitements anticancéreux s'appuient, en effet, sur le chauffage localisé de la tumeur à l'aide de nanoparticules d'oxyde de fer (hyperthermie magnétique). Ces nanoparticules sont accumulées dans la tumeur et peuvent absorber de l'énergie provenant de différentes sources externes pour générer une augmentation localisée de la température. On parle d'hyperthermie magnétique pour l'utilisation d'un champ magnétique alternatif ou d'hyperthermie ultrasonique pour l'utilisation d'ultrasons. Aujourd'hui, ce type de technologie est en plein essor, elle peut induire par la chaleur la destruction sélective de la tumeur sans occasionner d'effets secondaires graves/irréversibles. L'utilisation d'une ou plusieurs sources d'énergie peut offrir de telles possibilités, raison pour laquelle nous proposons de mener une étude préclinique sur modèle animal (murin) afin de définir les paramètres d'application de cette technique et son efficacité sur le cancer de la prostate.

Au laboratoire, nous développons plusieurs traitements innovants qui reposent sur l'utilisation de l'hyperthermie. Pour activer ce type de traitement, nous utilisons des nanoparticules d'oxyde de fer plus efficaces répondant mieux que des nanoparticules classiques aux différentes sources d'excitation comme le champ magnétique, les ultrasons ou la lumière. Nous avons, par exemple, démontré l'efficacité de ces nanoparticules dans le traitement, par hyperthermie magnétique chez la souris, de tumeurs mammaires humaines implantées en sous cutané ou sur des tumeurs de glioblastomes implantées en intracrânien. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une étude pré-clinique pour la mise au point d'un dispositif médical destiné à traiter le cancer et plus spécifiquement le cancer de la prostate non métastatique. L'objectif de ce projet est donc de définir les conditions optimales d'efficacité d'un traitement thermique en fonction de plusieurs sources d'énergie (champ magnétique alternatif ; ultrasons ; laser 808 nm), pour activer les nanoparticules d'oxyde de fer injectées, dans des tumeurs de prostate induites en sous cutané puis en orthotopique sur des souris mâles adultes. Ce projet a été conçu en utilisant la règle des 3R (directive n° 2010/63/UE, décret n° 2013-118, arrêtés du 1er février 2013). C'est-à-dire : en limitant au strict nécessaire le nombre d'animaux utilisé au cours de cette étude (Réduire) ; en définissant des points limites concernant le bien être des animaux, la prise en compte de la douleur, l'arrêt des traitements et l'euthanasie des animaux (Raffiner) ; en substituant l'utilisation des animaux par une méthode alternative quand cela était possible (Remplacer). Au préalable, une étude in vitro est réalisée pour déterminer la dose de nanoparticules à administrer dans les tumeurs chez la souris ainsi que les paramètres d'application des différentes sources d'énergie permettant d'activer le traitement thermique. Le nombre de souris (approximativement 584 sur une période de 5 ans) a été finement défini, au regard d'études similaires réalisées sur ce type de modèle et sur les expériences précédentes réalisées par notre laboratoire, afin de pouvoir définir de manière statistiquement significative le traitement thermique le plus efficace et envisager par la suite la réalisation d'un protocole clinique (chez l'homme). Des points limites

classiques mais aussi spécifiques ont été prévu concernant notamment d'éventuelles effets secondaires liés au traitement thermique sur les tissus sains des souris pour permettre la meilleure adéquation entre l'obtention des informations scientifiques et le respect absolu de la souffrance et du bien être animale.

**8958** Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au-delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés antitumorales de candidats médicaments (petite molécule ou biothérapie) afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement permettant de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 150 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Les étapes de validation d'un candidat médicament s'effectuent, autant que faire se peut, in vitro. Cependant, il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique des candidats médicaments dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels. Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé. Seuls les candidats médicaments ayant franchi les étapes de validation in vitro seront évalués in vivo réduisant le nombre de molécules à évaluer. Les animaux seront hébergés à 5 par cage afin de réduire leur stress. Les interventions se font sous anesthésie afin de supprimer toute douleur. La méthodologie utilisée implique une surveillance quotidienne rapprochée et différents points limites adaptés strictement appliqués afin de détecter tout effet indésirable et s'assurer du bien être des animaux et raffiner l'étude.

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 50 études visant à différents candidats médicaments sur différents modèles de PDX. Les études comprendront chacune 144 animaux au maximum, soit un total de 7200 animaux au maximum.

**8959** Projet complémentaire au projet #6535 2016110314184795V3 déjà autorisé.

Chez l'Homme, trois types principaux de cristaux sont responsables de maladies rhumatologiques : les cristaux d'urate de sodium sont responsables de la goutte, les cristaux de pyrophosphate de calcium (PPC) de la chondrocalcinose et les cristaux de calcium de phosphate du rhumatisme à hydroxyapatite. Les cristaux de pyrophosphate de calcium sont composés de 4 types différents. La prévalence de la chondrocalcinose est élevée (plus de 17% chez des patients âgés de plus de 70 ans). La présence de ces cristaux est le plus souvent sans symptômes mais peut aussi provoquer des crises inflammatoires aiguës récidivantes. Cette inflammation dépend principalement d'une protéine appelée interleukine 1b (IL-1b). La résolution spontanée est une caractéristique de ces crises inflammatoires, cependant les mécanismes de cette auto-résolution ne sont pas connus. De même, pourquoi les cristaux restent asymptomatiques n'est pas connu. Nous avons observé que des cristaux de PPC recouverts de protéines contenues dans le sérum de veau fœtal étaient moins inflammatoires que des cristaux nus. Chez l'Homme, les protéines présentes à la surface cristaux d'urate de sodium varient entre les phases inflammatoires et les phases non inflammatoires.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier i) l'inflammation déclenchée par les différents types de cristaux de pyrophosphate ; ii) les mécanismes par lesquels la présence des protéines à la surface des cristaux régule la réaction inflammatoire et sa résolution; iii) les variations de la couverture protéique à la surface des cristaux au cours de la réaction inflammatoire et iv) les mécanismes d'adsorption de protéines à la surface de cristaux de PPC.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons des modèles *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes de l'inflammation déclenchée par les cristaux de PPC nus ou recouverts de différentes protéines seront analysés *in vitro* avec la lignée de cellules monocytaires humaines (THP-1) et les résultats les plus pertinents vérifiés avec les cellules primaires puis ensuite *in vivo*.

*In vivo*, nous utiliserons le modèle murin de poche à air. La poche, créée en injectant de l'air stérile sous la peau des souris, mime une cavité articulaire. Ce modèle décrit depuis les années 1990 est reconnu au niveau international et permet de mimer la réaction inflammatoire microcristalline observée chez l'Homme. Dans ce modèle, l'inflammation débute 4h après les injections de cristaux, atteint son maximum entre 6 et 18h selon les cristaux utilisés, puis s'arrête entre 24-72h. La réaction inflammatoire se déroule sans signe local apparent (pas de rougeur ni de gonflement) et sans douleur apparente des souris (pas de modification du comportement). Elle est authentifiée en analysant les protéines et les cellules contenues dans la poche. La réaction inflammatoire induite par des cristaux nus ou recouverts de protéines spécifiques sera comparée en les injectant dans les poches à air créées chez des souris sauvages. Cette protéine galectine 3 peut en effet modifier la production de l'IL-1b et le comportement des macrophages, cellules majeures de l'inflammation microcristallines.

Le 18F-fluorodésoxyglucose (18F-FDG) est un traceur de plus en plus répandu qui permet d'obtenir rapidement des images très sensibles et de haute résolution grâce à la tomographie par émission de positons (TEP). La captation du 18F-FDG s'appuie sur le fait que lors d'un processus inflammatoire, les cellules mononucléaires et les granulocytes utilisent de grandes quantités de glucose au travers de la voie des pentoses phosphates.

Pour chaque expérience, 5 animaux/condition sont nécessaires, le sérum physiologique sera utilisé comme témoin négatif, condition où l'inflammation ne se produit pas. Au total, ce projet utilisera 23 souris sauvages incluant 3 souris qui permettront de mettre au point les conditions expérimentales de l'imagerie TEP. Ce nombre de 5 animaux/condition correspond à la quantité minimale nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante (tests non-paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal Wallis). Le nombre de souris sera réduit au minimum grâce aux expériences *in vitro*. L'imagerie non invasive, *in vivo*, sous anesthésie, avant et après injection des cristaux, permet des analyses et un recueil de données longitudinales plus puissantes et qui contribuera à la réduction et au raffinement à travers l'optimisation de l'utilisation de chaque animal comme étant son propre contrôle. Le modèle *in vivo* est indispensable à la compréhension des mécanismes observés *in vitro*. Les souris seront, à la réception dans l'animalerie, réparties de façon aléatoire par groupes de 5 dans un environnement enrichi. La poche à air ne sera créée qu'après une semaine d'adaptation dans l'animalerie. La poche est utilisée 6 jours après sa création. La création des poches et les injections des microcristaux se font sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Chaque injection dure au maximum 30 secondes, les souris sont endormies pendant au maximum deux minutes. Le comportement des souris sera observé après la création des poches. Dans la littérature, il n'est pas modifié par la présence d'une poche à air en sous-cutanée. Localement, l'état de la poche est surveillé de façon quotidienne. Le poids des animaux sera relevé avant et 6 jours après la création des poches, juste avant les injections des microcristaux. La TEP au 18F-FDG sera réalisée avant injection des cristaux pour déterminer le niveau basal de captation du radiotraceur au niveau de la poche à air puis 6 heures après injection des cristaux, temps où l'inflammation est maximale. Les résultats attendus permettront de mieux comprendre l'inflammation déclenchée par des cristaux de PPC et d'identifier des cibles thérapeutiques pour cette maladie qui n'a actuellement pas de traitement curateur.

**8960** Les anévrismes cérébraux correspondent à une dilatation fragile des artères du cerveau. Il s'agit d'une pathologie fréquente (60/1000 habitants) et grave qui expose au risque d'hémorragie cérébrale par rupture de l'anévrisme, conduisant au décès du patient dans plus de 50% des cas. Les traitements actuellement disponibles sont la chirurgie ou le traitement par voie endovasculaire (par l'intérieur des vaisseaux) notamment en implantant un tuyau à l'intérieur de l'artère pour empêcher le sang d'aller

dans la zone dilatée et le rediriger dans l'artère normale. Ces tuyaux à l'intérieur des vaisseaux sont facilement implantables, sans ouvrir le crâne, en passant tout le matériel par une artère périphérique et dirigé grâce à la radiologie, permettant de traiter les patients sans cicatrice avec retour à domicile 2 jours après l'intervention. Ces nouveaux dispositifs sont les stents flow diverters. Cependant, il a été rapporté avec ces nouveaux dispositifs des occlusions des collatérales des artères cérébrales stentées, ainsi que des ruptures des sacs anévrismaux à distance après l'implantation des dispositifs. Ces complications sont potentiellement mortelles et limitent l'utilisation des dispositifs aux patients les moins à risque.

L'objectif de notre projet est de mieux préciser les conditions qui peuvent provoquer la rupture des anévrismes après la mise en place d'un flow diverter et d'optimiser ces dispositifs pour améliorer leur biocompatibilité et leur efficacité pour le traitement des anévrismes. Le principal facteur responsable de ces ruptures étant la réaction inflammatoire provoquée par le contact du dispositif avec les éléments du sang et de la paroi vasculaire, notre projet est de greffer à la surface des stents une molécule capable de modérer la réaction inflammatoire locale et améliorer l'intégration du dispositif dans la paroi artérielle.

L'efficacité de notre stratégie sera établie dans un modèle de lapins, sous anesthésie générale.

Dans un premier temps un anévrisme cérébral sera créé au niveau de l'artère carotide droite par incubation d'un segment artériel limité avec de l'élastase, puis dans un second temps les stents recouverts avec le P8RI ou les contrôles seront implantés dans les artères du lapin pour traiter l'anévrisme. La guérison attendue de l'anévrisme cérébral par cette approche thérapeutique innovante sera étudiée sur des critères radiologiques et biologiques. Ce modèle d'anévrisme à l'élastase chez le lapin est le modèle le plus utilisé et validé dans le domaine car très reproductible et proche des anévrismes d'artère cérébrale chez l'Homme.

Ce travail expérimental est un préalable scientifique fondamental avant le transfert de cette technologie à l'Homme, dans le but de produire des dispositifs médicaux optimisés pour guérir les anévrismes cérébraux.

De plus afin de minimiser le nombre d'animaux, une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires. Ce projet va nécessiter l'utilisation de 28 lapins. Des mesures (utilisation d'analgésique, enrichissement des cages, ect.) ont été prise afin de réduire la contrainte et la douleur et donc d'améliorer le bien être des animaux avant, pendant et après chaque expérience. Des points limites ont été établi afin d'intégrer au maximum la préconisation des 3 R.

**8961** La stéatohépatite non alcoolique est une maladie du foie liée à l'obésité non liée à l'alcool, dans laquelle le foie une surcharge en graisse pouvant provoquer une inflammation, l'hépatite. Cet état est irréversible et peut évoluer en cirrhose ou en cancer. Elle est l'hépatite la plus répandue, la cause la plus fréquente est une alimentation mal équilibrée, riche en graisse et en sucre. Il existe des différences liées au sexe dans l'évolution de cette maladie dont les mécanismes sont mal connus. Nous proposons d'étudier le rôle des hormones sexuelles dans la stéatohépatite en utilisant des souris génétiquement modifiées pour améliorer les connaissances dans ce domaine. L'interaction entre les hormones sexuelles, le foie et le tissu adipeux nécessite d'utiliser un animal vivant. Pour évaluer l'importance des trois facteurs d'intérêt dans l'expérience (le sexe, le transgène et le régime), il est nécessaire d'utiliser des animaux mâles pour les comparer aux femelles, des souris transgéniques et leur contrôle non modifié, et un régime contrôle pour le comparer au régime gras induisant la maladie. Ainsi, 96 souris seront utilisées dans notre protocole, réparties en 8 groupes de 12 animaux, un nombre suffisant et nécessaire pour obtenir des résultats interprétables de façon fiable. Ce nombre d'individus a été retenu suite à un calcul du nombre de sujets nécessaires basé sur des données historiques. Des mâles et des femelles, transgéniques ou non, seront hébergés en groupes sociaux de 6 par cage avec enrichissement du milieu, en locaux d'animalerie appropriés, leur apportant les meilleures conditions de bien être et de santé. Ils recevront un régime riche en graisses et en sucre, dit "Western Diet" pendant 16 semaines, en comparaison d'animaux sous un régime standard pour souris de laboratoire. Un suivi hebdomadaire de la consommation calorique et hydrique, un prélèvement de sang à 8 semaines, et un test de tolérance au glucose à 12 semaines permettront d'évaluer l'évolution de la maladie, un anesthésique local sera appliqué sur la queue avant les prélèvements sanguins. En fin d'expérience, les animaux seront euthanasiés afin de

prélever du sang et des organes d'intérêt (foie, tissus adipeux et intestin) pour des explorations moléculaires et biochimiques.

**8962** La France n'a plus d'enseignement pratique des techniques de fécondation in vitro avec ou sans micromanipulations, ce qui rend difficile l'apprentissage pour les futurs acteurs médecins, pharmaciens, techniciens de laboratoire ou scientifiques.

La mise en place d'un enseignement pratique avec utilisations de gamètes de souris vise à pallier cette absence.

Dans cet enseignement, 30 souris B6-CBA-F1 mâles (ne subissant aucune procédure avant euthanasie) et 90 souris B6-CBA-F1 femelles par an seront nécessaires, soit un total de 600 souris (mâles et femelles) sur les 5 ans. Les animaux seront hébergés dans un établissement agréé respectant la réglementation en vigueur sur les exigences en termes de confinement.

Les mâles adultes seront euthanasiés pour être utilisés comme donneurs de sperme (prélèvement des épидидymes après dislocation cervicale).

Les femelles pré-pubères (4-6 semaines) recevront une stimulation hormonale par 2 injections intrapéritonéales à 2 jours d'intervalle, puis seront euthanasiées pour être utilisées comme donneuses d'ovocytes (prélèvements des oviductes après dislocation cervicale).

Les gamètes seront récupérés pour réaliser une fécondation in vitro dans les différentes conditions d'enseignements (avec ou sans micromanipulation).

Les mesures prises pour respecter la règle des 3R sont les suivantes :

a) la souche de souris (B6-CBA-F1) a été choisie en fonction de la très bonne réponse à la stimulation ovarienne des femelles et de la très bonne spermatogenèse des mâles, ce qui permet d'obtenir un meilleur rendement et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés.

b) seules les femelles feront l'objet d'une procédure légère (2 injections intra péritonéales) avant euthanasie pour prélèvement d'organes, les mâles ne subiront aucune procédure avant euthanasie pour prélèvement d'organes ;

c) Aucune douleur, souffrance ou angoisse pour ce projet classé léger puisqu'il s'agit d'une superovulation (injection en intrapéritonéal d'hormones) selon les bonnes pratiques et les animaux seront hébergés dans des conditions enrichies (nestlet).

**8963** Au cours de la dernière décennie, le nombre de transplantations pulmonaires a largement augmenté dans le monde. Cependant, le nombre de patients éligibles à une transplantation pulmonaire dépasse largement le nombre d'organes disponibles. Cela s'explique, d'une part, par la pénurie de donneurs d'organes et, d'autre part, par un faible taux d'utilisation des poumons de ces donneurs.

La PPEV (perfusion pulmonaire ex-vivo) utilisée en routine clinique a montré que la méthode était sûre et reproductible pour une optimisation de la fonction pulmonaire de greffons dont toutes les caractéristiques ne sont pas optimales. Cette technique permet aussi l'évaluation des greffons pulmonaires provenant de donneurs décédés après arrêt circulatoire (DDAC) de la catégorie 3 de la classification de Maastricht, considérés comme étant à risque élevé de dysfonction post-transplantation pour n'avoir pas été vascularisés durant une période prolongée à température ambiante. Cependant la PPEV, est limitée à quelques heures car le greffon se dégrade au cours de la procédure. Une des explications de la détérioration des greffons pulmonaires réside dans l'absence de maîtrise des désordres biochimiques (perturbation du taux de sodium, potassium, chlore...) induits par cette méthode de perfusion d'organe isolé dans un circuit clos. Nous allons donc tester dans un modèle porcin de donneurs décédés après arrêt circulatoire l'impact de la normalisation du contenu hydro-électrolytique du perfusât en branchant en parallèle au circuit classique de PPEV une dialyse régulatrice pour stabiliser l'homéostasie en cours de la procédure et ainsi essayer d'augmenter la durée de survie et la qualité des greffons. A ce jour aucune alternative de synthèse, ou même de modèle cellulaire peut permettre ce type d'évaluation. En effet, il est indispensable pour tester l'utilité d'une dialyse dans l'amélioration des greffons pulmonaires en condition "ex-vivo" d'avoir accès à un animal modèle dont la transposition à l'homme peut être immédiate. Nous procéderons de deux façons distinctes avec trois groupes dans chaque. L'une avec prélèvement et perfusion immédiate du poumon et l'autre avec prélèvement et mise sur glace pour 24 heures puis perfusion du poumon. Dans un premier groupe témoin nous utiliserons au maximum 10 porcs pour chaque branche (20

animaux) qui seront perfusés avec un liquide sur lequel aucune modification ne sera apportée au cours de la procédure, tandis que dans un deuxième groupe composé de 10 porcs maximum pour chaque branche (20 animaux) nous utiliserons un liquide de Steen avec PPEV identique à la routine humaine (renouvellement d'un tiers du liquide toutes les deux heures). Le troisième groupe de 10 porcs maximum pour chaque branche (20 animaux) sera perfusé selon une technique d'ultrafiltration, soit un total de maximum 60 animaux. Après un court séjour dans nos locaux (moins de 15 jours) avec repas deux fois par jours avec surveillance, chaîne et jouet à disposition, les animaux sont euthanasiés après anesthésie pour prélèvement du cœur et des poumons en mono bloc.

**8964** L'un des enjeux majeurs pour les patients en service de réanimation est le sevrage de l'aide artificielle à la respiration (ventilation mécanique). En effet, les patients en échec de sevrage chez qui il est nécessaire de maintenir la ventilation mécanique ont plus de risques de décéder au cours de leur hospitalisation en réanimation. L'endurance des muscles respiratoires joue un rôle essentiel lors du sevrage de la ventilation mécanique, puisqu'elle doit être suffisante pour permettre une respiration spontanée non assistée. Il a été proposé que le manque de sommeil puisse diminuer cette endurance respiratoire, les patients en réanimation ayant un sommeil diminué et fragmenté. Quelques études ont effectivement retrouvé chez l'être humain une diminution de l'endurance respiratoire après privation d'une nuit de sommeil, mais aucune n'a encore été réalisée chez l'animal. Or au cours de ces études chez l'être humain ont été retrouvés des indices concernant une origine cérébrale de cette fatigue des muscles respiratoires.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'impact du manque de sommeil sur l'endurance des muscles respiratoires chez l'animal, d'en déterminer les mécanismes cérébraux, et de tester des substances thérapeutiques pour améliorer cette endurance dans des conditions de privation de sommeil.

Pour cela, nous réaliserons une épreuve d'endurance respiratoire chez des rats privés de sommeil durant une nuit, pour vérifier que l'effet délétère du manque de sommeil sur l'endurance respiratoire existe chez l'animal, puis nous récupérerons les cerveaux des animaux afin d'étudier l'activité passée des neurones au cours de l'épreuve d'endurance respiratoire, et d'identifier quelles sont les populations de neurones impliquées. Nous pourrions également tester l'effet d'un traitement éveillant sur l'endurance respiratoire.

Nous prévoyons d'employer 116 rats au cours de ce projet.

S'il est nécessaire de substituer à l'être humain un modèle animal pour étudier des mécanismes cérébraux qui ne sont pas accessibles aux différentes techniques d'imagerie actuellement disponibles, il n'est pas possible de remplacer l'animal par une culture cellulaire ou un modèle informatique ; en effet, nous étudions l'interaction entre différents organes (système et muscles respiratoire, système nerveux), et ce en fonction de deux états très différents de l'organisme (la veille et le sommeil), qu'il n'est actuellement pas possible de modéliser artificiellement.

Chaque groupe expérimental intègre le minimum d'animaux possible, afin de réduire le nombre de rats utilisés pour ce projet.

Les procédures expérimentales ont été raffinées au maximum pour limiter les contraintes et la souffrance des animaux. Les paramètres biologiques nécessaires à la détection du sommeil seront enregistrés par un appareil de télémétrie, nécessitant une implantation chirurgicale mais permettant de se passer de dispositifs externes ou filaires responsables d'une limitation des activités de l'animal lors de leur utilisation. La privation de sommeil s'effectuera sur une seule nuit afin de réduire le stress imposé à l'animal. L'épreuve d'endurance respiratoire nécessitera une immobilisation contrainte de l'animal, la charge respiratoire étant délivrée par un masque au museau, mais celle-ci sera totalement réversible sans séquelle (à la différence de la technique de l'occlusion de la trachée par un anneau implanté chirurgicalement) ; l'épreuve sera arrêtée avant que l'animal ne puisse développer une insuffisance respiratoire. Le stress lié à la nouveauté sera diminué par l'habituation de l'animal aux différents appareils (non fonctionnels) employés lors des procédures. Un traitement symptomatique de la douleur sera délivré si nécessaire. L'euthanasie nécessaire pour l'étude des cerveaux sera réalisée selon une méthode agréée.

**8965** L'ensemble des gènes responsable du développement de la glande mammaire, de la mise en place de la lactation et de la protection de ce tissu vis-à-vis des infections n'est pas connu. Il est nécessaire

de mieux connaître ces fonctions pour comprendre le développement des mammites (inflammation mammaire due à une infection bactérienne) et ainsi permettre de proposer des solutions alternatives aux traitements antibiotiques dans les élevages, d'améliorer le bien-être animal et de réduire les conséquences économiques pour les éleveurs. Nous savons que les gènes de la famille SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) jouent un rôle important dans ces fonctions. Dans l'espèce ovine, des études génétiques ont permis d'identifier un variant du gène SOCS-2 qui serait associé à une sensibilité accrue aux mammites et une augmentation de la production laitière. Le projet ici consiste à valider l'impact de ce variant sur la lactation. Pour cela nous utiliserons des souris transgéniques portant ce variant génétique. Le développement de la glande mammaire de ces animaux sera étudié à différents stades physiologiques (puberté, adulte, gestation, lactation et régression après lactation). Des prélèvements de glandes mammaires, de lait et de sang seront réalisés sur des souris. Le nombre de souris a été défini pour utiliser le minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, soit 10 souris de chaque lignée pour chaque stade physiologique soit un total de 360 femelles (240 femelles transgéniques et 120 femelles non-transgéniques) sur une durée de 5 ans. Lors de la collecte de lait, les animaux seront anesthésiés, puis les femelles et leurs descendants seront euthanasiés lors des prélèvements. Tous les animaux, transgéniques ou non, utilisés pour ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Aucune alternative à nos procédures expérimentales, tel que l'utilisation de culture cellulaire, n'est possible puisque nous étudions des processus physiologiques complexes tels que la gestation et la lactation. Dans un souci de raffinement les souris seront hébergées à plusieurs par cage afin d'éviter le stress dû à l'isolement, puis isolées seulement pour la mise-bas. De plus afin d'enrichir leur milieu de vie et de permettre la construction d'un nid, des morceaux de sopalin seront ajoutés dans leurs cages. Une réflexion sur le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'étude a été menée pour générer un nombre de données suffisantes pour effectuer des analyses statistiques fiables.

**8966** Le stress post-traumatique est la complication majeure suite à des événements dramatiques (guerres, abus sexuels, attentats ...). A ce jour, seuls les symptômes sont traités. L'exposition au stress est le facteur de risque majeur capable d'induire le stress post-traumatique ou la dépression. Ceci définit donc des populations à risques, exposées de façon récurrente à des situations extrêmement stressantes (armée, police ...). Pour ces personnes la prévention est un élément crucial. Si les thérapies comportementales sont utiles, il n'existe pas de traitement médicamenteux capable d'induire la résilience au stress.

La kétamine pourrait être une molécule candidate pour induire de tels effets. Cette molécule est surtout connue en tant qu'anesthésique, mais son administration unique, à une dose sub-anesthésique, est capable d'induire un effet antidépresseur qui perdure pendant plusieurs semaines. Ce mode d'action particulier est très différent des antidépresseurs classiques dont un plusieurs semaines de traitement sont nécessaires pour obtenir un effet. La kétamine constitue donc un excellent candidat pour induire la résilience au stress. Ainsi, chez la souris, l'administration kétamine la protège du développement de symptômes de types anxio-dépressif.

Si d'un point de vue mécanistique, il a été démontré que les effets de type antidépresseur-anxiolytique de la kétamine passaient par la neurogenèse adulte hippocampique. En revanche, aucune donnée n'existent pour vérifier l'implication de la neurogenèse adulte hippocampique dans les effets prophylactiques de la kétamine (le traitement est cette fois administré avant l'évènement stressant déclencheur de l'état de type anxio-dépressif). Ce problème sera abordé grâce au couplage de plusieurs technologies novatrices : nVoke, Optogénétique avec la microdialyse et le comportement. nVoke est un système de microscopie miniaturisé (1,8g) embarqué qui permet de visualiser l'activité des neurones grâce à de l'imagerie calcique chez des souris vigiles. L'optogénétique permet quant à elle d'activer ou d'inhiber l'activité électrique des neurones grâce à de la lumière appliquée en intracérébral grâce à des fibres optiques. Enfin la microdialyse permet d'évaluer les niveaux intracérébraux de neurotransmetteurs. Le test comportemental utilisé pour ce projet est le test du « Novelty Suppressed Feeding » où les souris mise à jeun pendant 24 sont placées dans une enceinte éclairée avec de la nourriture en son centre. Dans ce test la latence à aller se nourrir est dépendante de la neurogenèse adulte hippocampique. Ce couplage de matériel miniaturisé est peu

contraignant pour l'animal, il s'agit en effet d'un système léger. Le test comportemental implique quant à lui une mise à jeun de l'animal pendant 24 heures ce qui engendre un stress modéré.

Pour l'ensemble de ce projet, 400 animaux seront utilisés. Ce nombre prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux, de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser *in vitro* ou *in silico* des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. L'ensemble du projet aura à cœur de conserver les animaux dans un état de confort optimal et pour ce faire des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire. Notre expérience se basera sur plusieurs techniques combinées. Ceci présente l'avantage de générer une quantité de données importante pour chaque animal, et en limiter ainsi le nombre.

Globalement, ce travail permettra une compréhension plus approfondie du rôle de la neurogenèse adulte hippocampique dans la résilience au stress. Il s'agit d'une étape d'une potentielle mise au point d'une thérapie préventive du stress post-traumatique qui serait un outil très intéressant pour des populations à risques, exposées régulièrement à des situations extrêmes.

**8967** Les glioblastomes (GB), sont les tumeurs cérébrales primitives rencontrées le plus fréquemment chez l'adulte et qui présentent une médiane de survie n'excédant pas 15 mois. Ce sont des tumeurs hautement hypoxiques, or, cette hypoxie intratumorale représente un obstacle majeur à l'efficacité des traitements conventionnels que sont la radiothérapie et la chimiothérapie. L'hypoxie est à ce titre associée à un très mauvais pronostic. Plusieurs stratégies de réoxygénation des GB ont été proposées afin de palier l'hypoxie dans les glioblastomes mais celles-ci se sont avérées inefficaces car c'est le cerveau sain et non la tumeur qui bénéficie le plus de la réoxygénation. Nous proposons donc l'utilisation de nanomatériaux (NM) poreux, capables i) d'incorporer et de véhiculer des gaz hyperoxiques mais également divers éléments chimiques, tels que le gadolinium (Gd) et ii) de cibler spécifiquement la tumeur et non le tissu sain. Cette stratégie de NM pourrait ainsi permettre non seulement de lutter contre l'hypoxie mais également de radiosensibiliser directement les cellules tumorales par le Gd.

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

Ces études seront réalisées sur des souris Nude et C57bl/6 (420 souris) ainsi que sur des rats Nude (80 rats). La stratégie de vectorisation de gaz par les NM a déjà été validée sur des cultures cellulaires de GB. Cependant, la tumeur étant un environnement complexe, les méthodes de substitution trouvent leur limite et la validation formelle sur animaux est nécessaire.

Notre expertise des modèles tumoraux et les travaux antérieurs de l'équipe ont pu montrer que 10 animaux par groupe sont nécessaires afin de réaliser des tests statistiques, et ainsi comparer les effets des différents traitements testés. Dans le principe de réduction du nombre d'animaux à utiliser, l'efficacité des NM sera évaluée par comparaison au traitement standard de radiothérapie au moyen de l'imagerie IRM permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux dans les études. De plus, une des procédures détaillées ci-après peut être réalisée sur un même animal diminuant ainsi le nombre d'animaux utilisés. L'utilisation de l'IRM nous permettra également de suivre l'évolution des volumes tumoraux et ainsi d'arrêter le protocole si les tumeurs sont trop volumineuses.

Le bien-être des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel formé 7J/7. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes et bénéficient d'un enrichissement avec la présence d'igloo. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. Ainsi, l'anesthésie est réalisée par utilisation d'isoflurane (dans un mélange) N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> pour les procédures de chirurgie et d'imagerie. L'analgésie est elle assurée par utilisation de buprénorphine injecté en sous-cutanée.

**8968** L'épilepsie du lobe temporal (TLE) est une des formes les plus courantes d'épilepsie chez l'adulte et pour laquelle 40% des patients sont réfractaires aux pharmacothérapies actuellement disponibles. La seule alternative est d'enlever par chirurgie la zone cérébrale responsable de l'épilepsie. Notre projet a donc pour but d'établir une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur la thérapie génique.



Une zone particulièrement épileptogène dans le TLE est l'hippocampe constituant ainsi le foyer des crises épileptiques. Celui-ci est constitué de cellules spécifiques nommées cellules granulaires et qui forment des connexions (synapses) entre elles appelées « récurrents ». Lors du TLE, il se produit une réorganisation par bourgeonnement de ces connexions récurrentes excitatrices menant à une suractivité synchronisée des neurones. Un recrutement de récepteurs au glutamate de type kaïnate a été observé au niveau de ces synapses aberrantes. Une inhibition de ces récepteurs induit une diminution des crises.

Avant d'initier une thérapie génique chez les patients, nous devons valider la stratégie au niveau préclinique. Le projet vise donc à développer un ou des outils de thérapie génique chez la souris permettant de diminuer l'expression des récepteurs kaïnate au niveau des cellules granulaires de l'hippocampe. Ces outils seront injectés dans le cerveau des souris par stéréotaxie pour ensuite déterminer la fonctionnalité et la quantification de ces outils.

En termes de remplacement dans la règle des 3R : Etant donné que la réorganisation des circuits neuronaux est un des éléments clés participant à la genèse et la propagation des crises chroniques, le modèle animal dans son ensemble est indispensable. De plus un modèle murin d'épilepsie du lobe temporal a été développé par des collaborateurs et il est donc nécessaire de mettre au point ces inhibiteurs chez la même espèce.

En ce qui concerne la réduction, nous utiliserons au maximum 225 souris sur 1 an. Une moyenne de 10 animaux par groupe sera utilisée pour réaliser les tests d'électrophysiologie et de 5 par groupe pour les expériences de RT PCR et Western Blot, et obtenir ainsi des conditions statistiques fiables. Enfin dans un souci de raffinement toutes les procédures seront réalisées par une personne formée et des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales (utilisation d'analgésiques locaux, suivi post-opératoire, régulation thermique). De même un enrichissement des cages est constitué de petites maisons en papier mâché que les animaux utilisent pour se cacher, et établir des liens sociaux.

**8969** Nous avons montré in vitro que certains globules blancs qui ont un rôle anti tumoral sont régulés très finement par une molécule que l'on appelle IRF1. Il existe 2 formes d'IRF1 : A et B, et la balance entre A et B confère une activité intense ou modérée aux globules blancs. In vitro, nous avons pu montrer qu'une molécule très fortement présente dans les cancers et appelée TGFb fait varier la balance A/B et par ce biais diminue les propriétés antitumorales des globules blancs.

Nous voulons maintenant confirmer nos résultats dans des modèles animaux. Nous pensons pouvoir réaliser cette démonstration en 24 mois. Pour que nos résultats soient fiables, nous voulons utiliser 2 types de souris différentes ainsi que des souris génétiquement modifiées (absence de la molécule IRF1). Ces souris recevront des injections de TGFb ou d'une molécule bloquant le TGFb ce qui nous permettra de confirmer que ce que nous avons vu in vitro existe aussi dans un animal. Dans deuxième temps, nous voulons utiliser des médicaments pour corriger le déséquilibre entre A et B. Pour cela, nous utiliserons des chimiothérapies qui sont couramment données aux malades atteints de cancer. Concrètement, nous injecterons des cellules cancéreuses à des souris. Quand les tumeurs seront détectables, nous les traiterons par chimiothérapies. Une semaine plus tard, nous analyserons les globules blancs des souris au laboratoire. Finalement, nous voulons démontrer que la modification de la balance A/B pourrait être une cible thérapeutique. Pour cela nous avons 2 stratégies. Pour la première stratégie, nous générerons in vitro des cellules avec des balances A/B variables et nous les utiliserons pour faire de la thérapie cellulaire à des souris porteuses de tumeurs. Nous évaluerons l'effet sur la progression tumorale. Pour la seconde stratégie, nous nous appuierons sur les résultats obtenus au cours de nos tests de chimiothérapie pour comparer l'efficacité de celles qui changent la balance A/B de façon favorable à celles qui change la balance A/B de façon défavorable (ou qui ne change rien). A la fin de ces expériences, les souris seront mises à mort et nous en profiterons pour étudier les tumeurs et les organes lymphoïdes de ces souris. Pour réaliser la totalité de ces expériences et pour pouvoir valider les observations de manière statistique, nous aurons besoin de 780 souris des 3 souches mentionnées ci-dessus.

La mise en place de ce projet s'attachera à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, après concertation avec un méthodologiste nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en conservant la puissance requise pour les tests statistiques. Pour cela, nous avons choisi de

travailler avec une cohorte prospective puis une cohorte de validation permettant de réduire le nombre d'individus. Les analyses biologiques seront effectuées sur tous les animaux également dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Des études préliminaires ont été réalisées sur des cultures de cellules in vitro remplaçant ainsi l'utilisation d'animaux. A l'heure actuel, il est nécessaire pour nous de confirmer ces résultats in vivo pour nous assurer que les observations obtenues in vitro sont réelles dans un contexte plus complexe comme un organisme vivant. Enfin, les procédures présentant un inconfort potentiel (injections et mise à mort) seront réalisées sous anesthésie permettant ainsi le raffinement et les animaux seront observés quotidiennement pour prévenir les risques de souffrance.

**8970** Un stress environnemental négatif modifie la flore intestinale et favorise le développement de troubles anxieux, de la dépression et du syndrome métabolique. Ainsi, des souris exposées à l'activation de l'immunité maternelle (MIA) ou à un régime riche en graisses (Diet Induced Obesity ou DIO) présentent des anomalies de leur flore intestinale, des troubles métaboliques et des comportements anxio-dépressifs. A contrario, un environnement dit « enrichi » (EE), dans lesquelles les souris sont exposées à des stimulations sensorielles, motrices, sociales et cognitives, limite chez la souris, le développement de troubles de type anxio-dépressifs. Bien qu'encore très fragmentaires, les données de la littérature montrent que l'EE (par contraste avec un environnement standard SE) augmente les capacités motrices et mnésiques des souris, améliore l'apprentissage et promeut la neurogenèse et la plasticité synaptique hippocampique. Nous avons montré que les souris hébergées en EE présentent une flore bactérienne plus diversifiée que les souris SE et notamment enrichie en bactéries *Akkermansia muciphila* (Akk). Akk est déjà décrite dans la littérature comme une bactérie bénéfique sur la réparation de la barrière intestinale en cas de lésion et sur les troubles métaboliques induits par un régime gras dans le modèle DIO. De plus, une protéine de la paroi d'Akk, appelée Amuc récapitule les effets bénéfiques d'Akk sur le métabolisme, permettant de réaliser des essais cellulaires.

Nos objectifs sont d'étudier les effets de l'EE sur le comportement et le tractus gastro-intestinal, la transplantation fécale d'une flore provenant de souris élevés en EE dans les modèles DIO et MIA, et d'élucider les mécanismes par lesquels Akk peut inverser l'impact délétère de l'environnement sur la physiologie et le comportement. Dans ce projet, nous appliquerons la règle des 3 R :

**Remplacer** : En parallèle des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences in vitro dans des lignées cellulaires pour tester l'effet d'Akk sur la barrière intestinale et le système nerveux. Puisque les effets bénéfiques d'Akk sont en partie récapitulés par l'administration de la protéine Amuc, nous traiterons avec Amuc des cultures de lignées cellulaires et regarderons les effets bénéfiques de ce traitement sur la perméabilité cellulaire dans la lignée de cellules épithéliales humaines Caco-2 et sur l'expression de marqueurs neuronaux dans une lignée neuronale humaine SHSY5Y. Cependant, le recours à l'animal sera nécessaire pour évaluer l'impact du traitement Akk à l'échelle de l'organisme entier au niveau gastro-intestinal et comportemental.

**Raffiner** : Nos conditions d'élevage impliquent : stabulation par 5 animaux ou plus, enrichissement du milieu (lorsque cela est possible), température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi appuyé sur une grille de score permettra de détecter les souffrances potentielles et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de point limites précoces et adaptés.

**Réduire** : Nous utiliserons des tailles d'échantillon garantissant une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats de comportement. Ainsi, des calculs de puissance réalisés avec un logiciel dédié ont permis de déterminer au plus juste les effectifs de groupe à utiliser pour observer des effets de taille moyenne avec les tests statistiques adéquats. Un total de 1125 animaux est requis pour ce projet. Néanmoins, nous procéderons de manière séquentielle, et les Procédures n°4, 5, 9, 10 ne seront pas réalisées si les résultats obtenus dans les procédures précédentes ne justifient pas de continuer l'expérimentation dans le modèle MIA et DIO, réduisant le nombre d'animaux initialement prévu à 525.

**8971** Projet :

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleurs pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que cette mutation est fréquente dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré que cette mutation sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier le rôle de la mutation d'HSP110 dans la tumorigenèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique pour Hsp110 qui reproduit la mutation humaine. Notre hypothèse est que la mutation d'HSP110 pourrait induire une amélioration de la réponse à la chimiothérapie et modifier le tableau clinique (ralentissement du phénotype tumoral, augmentation de la survie). Les souris MSH2KO HSP110 seront donc comparées aux souris MSH2 KO pour vérifier notre hypothèse. Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 180 souris transgéniques pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement 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. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

**8972** Les cellules intercalaires sont des cellules spécialisées dans la régulation de l'état acido-basique. Elles sont présentes dans le rein et participent à la sécrétion d'acide ou de bicarbonate dans l'urine. Nous avons identifié récemment un récepteur tyrosine kinase dans les cellules intercalaires et nous souhaitons déterminer dans ce projet l'implication de ce récepteur dans la régulation de l'état acido-basique et la fonction des cellules intercalaires. Ce récepteur est également la cible de traitements anticancéreux ce qui pourrait expliquer les effets secondaires de ces traitements tels que des troubles électrolytiques ou l'apparition d'une hypertension.

La souris est le seul modèle animal dont l'inactivation génique est particulièrement bien caractérisée. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier l'implication d'un récepteur, d'une voie de transduction ou d'un système hormonal dans la régulation physiologique de la balance sodée et de l'état acido-basique. Le recours à des méthodes alternatives a été envisagé mais l'étude de paramètres biologiques tels que les éléments de la balance acido-basique se situe à un niveau d'intégration tel que le recours à l'animal est nécessaire. Un bon modèle cellulaire n'est pas disponible pour les cellules intercalaires rénales.

Nous estimons au total que 32 souris seront nécessaires pour ce programme de recherche de 2 ans. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le permettent. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limites sont respectés afin d'éviter toute souffrance aux animaux.

**8973** L'adénomyose est une pathologie utérine chronique, oestrogéno-dépendante dont la physiopathologie demeure mal élucidée bien que l'immunité innée et acquise semblent jouer un rôle important. L'adénomyose se définit par la présence d'endomètre au sein du myomètre utérin entraînant une hypertrophie de ce dernier. Aujourd'hui les traitements disponibles sont principalement l'hystérectomie ou des traitements hormonaux empêchant la fertilité. L'hétérogénéité clinique de cette pathologie ainsi que sa prévalence élevée (elle touche environ 30% des femmes en âge de procréer) en font un centre d'intérêt pour de nombreux spécialistes. L'adénomyose est fréquemment associée à une autre maladie gynécologique inflammatoire, l'endométriose.

Les manifestations cliniques principales de l'adénomyose sont des ménorragies, des douleurs pelviennes ainsi qu'une diminution de la fertilité et une augmentation des fausses couches spontanées. La présence d'un infiltrat inflammatoire avec la présence de macrophages ainsi que de messagers solubles du système immunitaire au sein du tissu adényosique, mis en évidence dans différentes études confirme l'implication de l'immunité dans le développement de cette maladie.

Au cours de cette étude, nous souhaitons comprendre les mécanismes immunitaires (réponse cellulaire ou humorale) impliqués dans le développement de l'adénomyose grâce à un modèle murin. Dans un premier temps, nous reproduirons le modèle murin d'adénomyose. Nous réaliserons une analyse histologique des cornes utérines. Ce modèle sera reproduit chez des souris immunodéficientes pour les lignées lymphocytaires T et/ou B, afin de préciser le type de réponse immunitaire impliquée dans le développement de l'adénomyose.

Dans un second temps, nous étudierons l'influence de l'endométriose sur le développement de l'adénomyose dans notre modèle murin et ses conséquences obstétricales. Pour cela, nous implanterons des fragments de cornes utérines à des souris atteintes d'adénomyose, afin de mimer l'endométriose.

Dans un troisième temps, des souris présentant de l'adénomyose, en association ou non à de l'endométriose, seront accouplées afin d'étudier par échographie l'influence de l'adénomyose sur la gestation. Les résorptions fœtales, l'adénomyose des cornes utérines et l'endométriose seront étudiées.

Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber leur comportement. Au total nous utiliserons 525 animaux.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit à son minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en pré et post opératoire. Pour minimiser les stress, les procédures d'imagerie et les prélèvements sanguins se feront sous anesthésie générale. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes immunitaires impliqués dans le développement des lésions d'adénomyose afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques n'impactant pas la fertilité.

**8974** Projet :

Chez l'homme, les retards de croissance, qu'ils apparaissent chez le fœtus ou juste après la naissance, sont associés avec une plus grande fréquence de maladies cardio-métaboliques. Notamment, des perturbations de la balance énergétique entraînant des variations de poids corporel à l'âge adulte, et une résistance à l'insuline sont fréquemment observées.

Nos données préalables chez la souris montrent que la sur- ou sous-nutrition en période postnatale précoce (durant la lactation) est suffisante pour programmer de manière permanente la sécrétion de l'hormone de croissance chez l'adulte, dont la dérégulation semble être un facteur aggravant dans

l'émergence des pathologies citées ci-dessus. Nombre des organes impliqués se développent durant les périodes anté- et post-natales.

Le protocole soumis ici est conçu pour déterminer chez la souris i) l'impact sur la régulation de la prise alimentaire à l'âge adulte de cette sur-/ sous-nutrition en période postnatale précoce sur des souriceaux nés avec un retard de croissance intra-utérin ainsi que la contribution d'une éventuelle dérégulation de la prise alimentaire dans les variations de poids corporel induite par le retard de croissance intra-utérin (RCIU) suivi de différents régimes de lactation, ii) dans quelle mesure la nutrition périnatale affecte la maturation des axes endocriniens iii) quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets à long terme tels que la résistance à l'insuline. Etant donnée les mécanismes en jeu, impliquant une physiopathologie complexe, et les dérégulations sur le long terme, l'approche in vivo est obligatoire.

Type d'animaux : Etant donné le rôle du placenta dans les mécanismes physiopathologiques étudiés, nous avons choisi le modèle murin (mammifère placentaire), qui est petit et de bonne productivité, ce qui réduit le nombre de femelles génitrice nécessaire.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 884 souris pour une durée maximale de 5 ans répartis comme suit : 212 fondateurs et de 672 F1 (336 mâles et 336 femelles). 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. Le nombre minimal de souris utilisées lors de ce protocole est calculé afin d'obtenir la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques recherchés. Le nombre de souris, ainsi que les timings de traitement et des mesures diverses ont pu être calculés grâce à la profonde connaissance de ce modèle murin qu'a le laboratoire, ainsi que des mécanismes en jeu. Ainsi, nous étudierons une dose unique de restriction protéique afin d'induire le RCIU et nous mesurons les effets à des âges clefs mis en évidence lors de nos précédentes études.

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

**8975** Les calpainopathies sont des maladies génétiques rares et de transmission récessive et sont dues à des mutations d'une enzyme du muscle squelettique appelée calpaine 3. Ces pathologies se manifestent vers l'âge de 10-20 ans, touchent principalement les muscles proximaux des ceintures musculaires (scapulaire et pelvienne). Les muscles de la face, ainsi que les muscles respiratoires et cardiaques sont épargnés. Il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. Dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques pour le traitement des calpainopathies (défiance en Calpaine 3), les modèles de souris disponibles ont un phénotype (quel que soit les lignées) très modéré. Nous avons récemment généré un modèle rat qui présente un phénotype plus proche de la pathologie humaine. Ce projet vise à évaluer dans le modèle rat des produits de thérapie tel que le transfert de gène de la calpaine 3 en utilisant des vecteurs viraux, ou des traitements pharmacologiques selon différentes voies d'administration afin d'évaluer l'impact sur la restauration du phénotype des animaux malades au niveau histologique et fonctionnel.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

-Remplacer :

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, les modèles murins reproduisent avec fidélité l'ensemble des aspects cellulaires et les symptômes de la maladie. Aucun substitut n'est disponible, et le remplacement n'est pas possible dans ce projet.

-Réduire :

Les protocoles d'étude seront réalisés en incorporant le nombre minimal d'animaux permettant de tirer des conclusions significatives. Aussi, une étude préalable de caractérisation a été réalisée permettant de définir le niveau d'atteinte et les caractéristiques des animaux. Nous réaliserons nos protocoles uniquement sur des individus mâles. Les animaux contrôles seront mutualisés entre les procédures chaque fois que possible. Pour les études en intramusculaire, les muscles controlatéraux serviront de contrôles, évitant le recours à des groupes d'animaux contrôles supplémentaires.

-Raffinement :

Le modèle choisi est adapté à l'évaluation thérapeutique d'animaux déficients en calpain 3 et un nombre minimal d'animaux permettant d'avoir une significativité statistique sera utilisé. De plus le bien-être animal sera assuré par de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu, un suivi régulier des animaux, l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées, notamment la gestion de la douleur que les animaux pourraient ressentir. Le modèle rat, ayant un phénotype non dommageable, aucune procédure particulière de raffinement n'est donc à rajouter pour ce modèle par rapport à des rats sauvages.

Dans ce projet, 159 animaux (une partie des animaux étant sains, l'autre partie étant déficients en calpain 3) seront nécessaires pour réaliser notre étude. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études.

**8976** Cette étude cherche à comprendre l'influence du démonstrateur sur l'apprentissage social chez des perruches calopsittes. L'apprentissage social est un phénomène bien documenté, toutefois, les études qui s'intéressent au rôle du démonstrateur ou du modèle sur les capacités d'apprentissage sont moins nombreuses. Des études montrent que les oiseaux préfèrent apprendre de certains démonstrateurs, selon des critères de familiarité, d'apparement, de dominance ou encore de sexe. Toutefois, il n'existe pas encore d'étude portant sur l'appartenance du démonstrateur à la même ou à une autre espèce que les oiseaux. Nous cherchons donc ici à étudier l'influence de l'espèce du démonstrateur (perruche calopsitte ou humain) sur les capacités d'apprentissage par observation de l'utilisation d'un nouvel outil.

Notre modèle est la perruche calopsitte (*Nymphicus hollandicus*), qui est une espèce d'oiseau social et qui possède un gros cerveau proportionnellement à sa taille, ce qui en fait un bon modèle pour une étude sur l'apprentissage social. Nos sujets pour l'étude sont 13 perruches calopsittes. Dans une première phase, nous leur ferons regarder des vidéos de démonstration avec soit un modèle calopsitte (qui sera l'un des oiseaux de la volière), soit un modèle humain (qui sera un membre du laboratoire que les perruches connaissent). Dans ces vidéos, le démonstrateur montre l'utilisation d'un outil, et nous regarderons dans une phase test si le sujet a bien appris la fonction de l'outil lors de cette phase de démonstration. Nous utiliserons au total 4 sets d'objets. Notre hypothèse est que les perruches vont apprendre préférentiellement la fonction des outils lorsque le démonstrateur est une calopsitte plutôt que lorsqu'il est humain. En effet, un démonstrateur de la même espèce a plus de chances de posséder des informations fiables pour son espèce, contrairement à un démonstrateur d'une espèce différente. Cette étude permettra de savoir (1) si les perruches calopsittes sont capables d'apprendre la fonction d'un outil grâce à un démonstrateur, (2) si l'appartenance du démonstrateur influence cet apprentissage, et ainsi, (3) si les calopsittes considèrent l'espèce comme un critère d'appartenance à un groupe. Ce projet se fera en parallèle avec une autre étude avec des enfants de 4 ans, qui fera aussi l'objet de l'avis du comité d'éthique approprié. La comparaison de l'humain avec une espèce éloignée va permettre de mieux comprendre les facteurs qui ont pu favoriser l'apparition et le développement de capacités liées à l'apprentissage social au cours de l'évolution, et aussi si ces capacités sont propres à l'être humain.

Pour ce qui est de l'application des 3 R, le recours à l'animal vivant est indispensable pour répondre à nos questions, mais peu d'oiseaux (le minimum pour pouvoir obtenir des résultats généralisables) sont utilisés au cours de ce projet et aucune expérience n'est invasive. Les situations de stress auxquelles les animaux seront exposés sont les suivantes : privation alimentaire (n'excédant pas 2 heures) afin de motiver les individus et introduction de nouveaux objets dans la volière (ils sont néophobes). Un oiseau ne sera jamais forcé à participer à une expérience et pourra à tout moment l'arrêter (en s'envolant par exemple). Nous interrompons aussi l'expérience si l'oiseau montre des signes de stress ou de mal-être.

**8977** L'objectif des protocoles d'immunisations lapins est la production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, qui sont utilisés à des fins scientifiques et médicales. Les applications pour l'utilisation des anticorps peuvent être diverses comme par exemple :

- fabrication de tests de diagnostic permettant la détection de maladies en médecine humaine
- préparation de médicaments pour usage en médecine humaine (médicaments biologiques)
- applications diverses en recherche et développement.

La production d'anticorps sur lapins est réalisée par administration d'antigène accompagné ou non d'adjuvant, puis récolte de sang, sérum, plasma ou d'organes des animaux pour envoi au scientifique qui pourra réaliser la purification et l'extraction des anticorps d'intérêt.

Le scientifique justifie par écrit de nous sous-traiter la production d'anticorps ne pouvant pas être réalisée in vitro dans l'état de l'art. Cette production sera réalisée sur une quantité d'animaux minimum suffisante et nécessaire pour produire la quantité d'anticorps désirée.

Les lapins sont hébergés individuellement avec contact visuel et olfactif, et des pep-toys comme enrichissement (balles de cellulose, anneau en plastique si nécessaire). Ils sont observés chaque jour par du personnel formé et compétent et des points limites sont mis en place. En cas de geste douloureux, une anesthésie générale est prévue. En raison de l'interaction possible de l'analgésie avec les antigènes l'utilisation d'analgésique pourrait avoir un impact sur le résultat final du protocole. C'est pourquoi celle-ci n'est pas réalisée. En revanche, une observation quotidienne des animaux est mise en place pendant toute la durée de l'étude, avec une pesée hebdomadaire de l'ensemble des lapins, et une attention particulière est portée aux sites d'injection 48h après les administrations afin de détecter toute réaction anormale (observation spécifique des sites d'injections lors des observations quotidiennes 24h et 48h après les injections). En cas de lésion au point d'injection, une surveillance spécifique sera mise en place, et un traitement pourra être appliqué après validation du scientifique et du vétérinaire. Si cette lésion montre des signes cliniques sévères, l'animal sera immédiatement euthanasié.

Le nombre de lapins prévu pour ce projet est au maximum de 5003 pour toute sa durée.

Ce nombre correspond à une estimation du besoin des scientifiques basé sur notre expérience des années précédentes.

**8978** Le cancer de la prostate est le plus répandu des cancers masculins avec 71 000 nouveaux cas annuels. L'amélioration de la prise en charge et du diagnostic précoce a permis de passer de 72% de survie (1989-1993) à 94% de (2005-2010). Malgré ces progrès il reste au troisième rang des décès par cancer chez l'homme. Afin d'améliorer la prise en charge des patients que ce soit du diagnostic au choix du traitement, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies. La Tomographie à Emission de Positrons (TEP) est un examen d'imagerie médicale capable de donner des images précises en 3D, de la répartition d'un traceur dans la totalité du corps. On appelle traceur, une molécule d'intérêt visant une cible biologique couplé à un isotope radioactif émetteur de rayonnements. En clinique, le traceur utilisé pour le diagnostic du cancer de la prostate est la 18F-Choline, cependant il ne permet pas de visualiser l'ensemble des cancers de la prostate surtout en cas de récurrence. Le but de cette étude est de déterminer si d'autres traceurs pourraient être capables d'orienter les médecins dans la prise en charge des patients. Pour cela nous souhaitons utiliser 2 lignées cellulaires provenant de profils différents de tumeurs de patients, les greffer sur 20 souris mâles et imager sur plusieurs semaines les animaux avec 6 traceurs différents. Ainsi nous pourrions apporter des réponses sur les profils tumoraux de cancer de la prostate et donner une preuve que les récurrences pourraient être visualisées par d'autres traceurs et donc prises en charge plus

rapidement. La règle des 3R à été envisagée lors de l'élaboration du projet. Le nombre d'animaux a été réduit, notamment par l'utilisation de l'imagerie non invasive pour suivre des modèles in vivo uniques parfaitement décrits dans la littérature (modèle de greffe sous-cutanée de cancer de la prostate). De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (euthanasie anticipée en cas d'atteinte des points limites) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

**8979** La formation est destinée aux personnes ayant suivi la formation concepteur de projet et ayant obtenu l'autorisation d'expérimentation animale. Le but est de former les 10 participants aux bonnes pratiques en chirurgie en illustrant avec un TP Cathétérisme artère carotide et cathétérisme chronique chez le rat puis surrénalectomie. Malheureusement la formation par vidéo ne peut pas être envisagée car les gestes doivent être appris et maîtrisés. Par contre afin de compléter la règle des 3 R, le travail par binôme ainsi que la réalisation de 2 procédures chirurgicales sur le même individu, ont été préféré pour réduire au maximum le nombre de rats utilisés. Il y aura donc 6 rats utilisés chaque année. Les animaux seront manipulés par des personnels compétents. Les animaux seront anesthésiés selon les règles en vigueur pour la durée de l'expérimentation et sacrifiés en fin de séance par une personne disposant des autorisations d'expérimenter. Pour la durée du projet 30 rats seront utilisés.

**8980** L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés (OMS, 2012) posant un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aigüe de l'infarctus cérébral est réalisée par injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traité du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable que de nouvelles stratégies thérapeutiques soit mises en place.

L'objectif de ce projet est de tester une stratégie adjonctive au tPA afin d'augmenter le taux de recanalisation/reperfusion après un AVC. Pour cela, cette stratégie thérapeutique sera étudiée à l'aide d'un modèle d'infarctus cérébral qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'AVC, pour lequel un caillot sanguin est directement produit dans la lumière artérielle. Cette étude sera réalisée chez la souris Swiss mâle du fait que ce modèle ai été développé et très bien caractérisé dans cette espèce. Les procédures seront organisées afin que toutes les manipulations douloureuses soient réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique. Le suivit de la reperfusion tissulaire ainsi que de la recanalisation vasculaire sera réalisé dans 8 conditions différentes sur 14 animaux par groupes. Soit un total de 112 souris pour l'étude complète.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci -dessous : La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de l'AVC. Un modèle in vivo est indispensable afin de pouvoir vérifier les effets de la reperfusion/recanalisation tissulaire. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier le potentiel effet neuro-protecteur de notre stratégie thérapeutique. Notre projet correspond à l'étape de validation in vivo qui fait suite aux validations réalisées in vitro, et ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. Les données de la littérature utilisant ce modèle ainsi qu'une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour pouvoir conclure d'un effet de notre stratégie thérapeutique. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages



standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs : Accident Vasculaire Cérébral, infarctus cérébral ; tPA ; fibrinolyse

**8981** Les cancers du cortex surrénalien sont des maladies rares mais très agressives et se présentent chez les enfants tout comme chez les adultes. Ces cancers présentent une occurrence variable suivant le sexe. Ainsi les femmes sont plus concernées (55%) que les hommes (45%) sans que cela ne soit pour autant expliqué et/ou compris.

Une caractéristique remarquable de la glande surrénale est sa capacité à se régénérer en permanence chez l'adulte et donc à conserver des cellules souches capables de se diviser et de se différencier pour remplacer les cellules du cortex surrénalien mortes. Ce phénomène d'homéostasie se produit au niveau de la partie extérieure de l'organe et est en équilibre avec une mort cellulaire programmée au centre de la glande surrénale. En résumé, les cellules prolifèrent, se différencient, migrent vers le centre et meurent pour laisser place à de nouvelles cellules et ce en continue.

Une étude statistique a mis en évidence la différence de taille des glandes surrénales chez la souris en fonction du sexe de l'animal. Ainsi, à partir de 3 semaines d'âge et jusqu'à la fin de leur vie, les glandes surrénales des femelles sont plus grosses que celles des mâles. Il y a donc une différence de la glande surrénale entre les sexes.

Malgré plusieurs études, l'identification des cellules souches (cellules immatures capables de se diviser) du cortex surrénalien ainsi que les mécanismes requis pour leur prolifération et leur activation sont mal connus. Dans notre laboratoire, nous étudions le renouvellement de la glande surrénale afin d'identifier quelles sont les cellules souches et comment celles-ci contribuent à la régénération de cette glande. Nous essayons également de comprendre ce qui influence la taille de l'organe suivant que l'on soit femme ou homme et si la taille et le renouvellement sont en lien avec la prévalence des cancers surrénaux.

Pour cela, nous souhaitons réaliser chez des souris adultes un traitement hormonal suite à une gonadectomie. En effet, nos résultats précédents ont prouvé qu'il y avait une différence d'activité des cellules souches entre les mâles et les femelles à partir de la puberté. Notre hypothèse est donc que les hormones sexuelles jouent un rôle crucial dans la prolifération et la migration des cellules souches du cortex surrénalien. Ainsi, dans ce PEA nous souhaitons étudier le rôle des hormones masculines et féminines sur le renouvellement cellulaire de la glande surrénale. La gonadectomie consiste à retirer les ovaires chez les femelles et les testicules chez les mâles. Cette expérience nous permettra d'arrêter la sécrétion d'hormones sexuelles normalement produites par les gonades femelles ou mâles et de remplacer ces hormones par un traitement de testostérone chez les femelles xx et d'œstradiol chez les mâles xy. Ainsi nous pourrons comparer l'effet des hormones masculines (testostérone) ou féminines (œstradiol) sur la prolifération cellulaire et le recrutement des cellules souches chez les animaux XX et XY. Afin de garantir un bien être optimal des animaux, ces derniers seront régulièrement surveillés.

Dans le but de réduire le nombre de souris utilisées, nous avons effectué des calculs statistiques pour déterminer le nombre minimal mais suffisant pour avoir des résultats significatifs. De plus, plusieurs analyses seront effectuées sur les mêmes échantillons afin de limiter le nombre d'animaux requis (Réduction).

En ce qui concerne le raffinement, l'usage d'anesthésiant et analgésiant lors de l'opération et en post-opératoire permettra de minimiser la souffrance animale. De plus, les souris seront surveillées suivant des grilles d'évaluations afin de leur éviter toute souffrance grâce à des points limites adaptés et précoces qui ont été déterminés en accord avec la réglementation européenne (Raffinement).

Enfin, comme nous cherchons à comprendre le fonctionnement de l'organe dans son ensemble et dans son environnement physiologique, il est indispensable pour notre recherche d'utiliser un modèle animale (Remplacement). Il n'existe pas à ce jour de système de génération in vitro de glandes surrénales fonctionnelles capables de sécréter et moduler la production d'hormones en fonction de stimuli extérieurs comme c'est le cas chez un organisme vivant.

Au total, 208 souris seront utilisées sur 5 ans dans ce projet.

**8982** En 15 ans, la production mondiale de viande de lapin a progressé de 45%. Elle est cependant très influencée par les maladies, parmi lesquelles la plus fréquente est la pasteurellose, due à *Pasteurella multocida*. Cette bactérie est responsable de pathologies variées chez l'adulte (abcès, problèmes respiratoires, avortements) et provoque parfois une mortalité des lapereaux après le sevrage. La fréquence croissante d'infections à *Pasteurella multocida* engendre une utilisation excessive d'antibiotiques, ce qui affecte l'environnement et induit un risque d'antibio-résistance microbienne. La sélection génétique pour la résistance des animaux à la maladie est une voie essentielle pour développer des systèmes d'élevages durables. Associant généticiens, pathologistes et immunologistes et soutenu par la filière cynicole, le projet scientifique RELAPA (Résistance du Lapin à la Pasteurellose) vise à inoculer expérimentalement une population de 1000 lapins représentatifs du cheptel européen, de mesurer finement leur réponse à l'épreuve infectieuse (croissance, température, réponse anticorps, autopsie, comptage des bactéries dans le foie et la rate) et de les génotyper, afin de détecter les régions du génome associées à la résistance à la pasteurellose. Les résultats de ce projet permettront aux sélectionneurs français de définir des stratégies de sélection (sélection assistée par marqueur ou génomique) afin d'atteindre la résistance chez les animaux commerciaux.

Une biopsie d'oreille sera réalisée chez les mères des animaux soumis à l'infection expérimentale à l'aide d'une pince Allflex, afin d'effectuer un génotypage. Les inoculations des animaux expérimentaux se feront avec une autre demande d'autorisation.

L'effectif total de 1220 animaux utilisés inclut 120 femelles, 100 animaux témoins et 1000 animaux inoculés. Les femelles seront inséminées par des mâles de lignées commerciales : 10 mâles par lignée commerciale, et 6 lignées commerciales utilisées. Le nombre de mâles est le minimum qui garantit une bonne représentativité du niveau génétique des lignées commerciales (10 mâles pour chacune des 6 lignées). Le nombre de femelles est le minimum pour assurer une descendance de 1000 animaux. L'effectif de 1000 animaux inoculés est justifié par une analyse statistique de recherche de régions du génome associées à la résistance.

Le logement des animaux se fait dans le respect des règles de l'élevage conventionnel, à savoir bâtiment chauffé en hiver (18,4°C en moyenne), rafraîchi en été (21,4°C en moyenne), cages respectant largement la norme NF47-001 qui préconise une densité maximale de 45 kg/m<sup>2</sup> à 65j d'âge, car la densité effective pratiquée par l'élevage expérimental est 10 % inférieure à cette norme. Les conditions d'élevages sont les plus proches de celles des élevages commerciaux. La procédure de biopsie choisie est la moins stressante pour l'animal, car elle fait appel à la contention la moins longue (30 secondes par animal en moyenne). Elle remplace la prise de sang, qui est une procédure plus longue et donc plus stressante pour obtenir de l'ADN.

**8983** En France et dans le monde, l'incidence du cancer du pancréas et particulièrement l'adénocarcinome pancréatique est en augmentation. En 2012, l'incidence annuelle du cancer du pancréas était d'environ 12000 nouveaux cas. Le pronostic du cancer du pancréas est extrêmement péjoratif avec une survie globale à 5 ans inférieure à 5% tout stade confondu. Un tiers des patients présentent un cancer du pancréas localement avancé (CPLA), c'est-à-dire un cancer non opérable mais sans métastases. Une des options thérapeutiques prescrite pour les CPLA est une chimiothérapie associée à une radiothérapie standard. Compte tenu de la présence de tissu sains entourant la tumeur, les effets secondaires de la radiothérapie standard sont relativement élevés, ce qui nécessite de limiter les doses d'irradiation délivrées.

Le but du projet est de valider l'optimisation d'une chimiothérapie associée à une radiothérapie sur des tumeurs pancréatiques. L'étude sera réalisée sur des modèles de souris xénogreffées avec 2 types de lignées cellulaires tumorales pancréatiques humaines. Ces deux lignées cellulaires ont montré de bons résultats in vitro, mais avec des profils différents, d'où l'intérêt de les tester toutes les deux.

Une fois les tumeurs établies au niveau du flanc de l'animal, elles seront traitées par irradiation et chimiothérapie afin de mimer le traitement administré aux patients. L'objectif est d'étudier, grâce à ces modèles, des différences d'effet des traitements en vue de valider les résultats obtenus in vitro.

Les tumeurs finales obtenues sur souris ne dépasseront pas le volume limite de 2000 mm<sup>3</sup>. Le protocole d'irradiation sera mis au point de manière à protéger les souris au maximum et les irradiations seront administrées de manières ciblées.

Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique et dans le respect du principe de réduction, nous utiliserons, pour chaque lignée cellulaire xénogreffée, 130 souris (13 lots de 10 souris). Au final, pour l'étude in vivo réalisée sur deux lignées cellulaires pancréatiques, nous utiliserons un total de 260 animaux (souris).

En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des souris sera suivi régulièrement. Les souris seront anesthésiées dès que des procédures douloureuses et/ou stressantes (implantation de tumeurs, injection des traitements et séances d'irradiation) seront réalisées. Les souris et la croissance des tumeurs seront mesurés et évalués trois fois par semaine à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc.) et pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec mise à mort dès lors qu'un point limite sera atteint (Raffinement). Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement conformes à la validation de la cellule bien-être.

Enfin, seule cette étude in vivo permettra de valider les résultats obtenus précédemment in vitro.

**8984** L'ocytocine (OT) est un neuropeptide synthétisé dans l'hypothalamus qui joue un rôle dans la parturition et l'allaitement mais qui agit aussi comme neuromodulateur dans le système nerveux central pour moduler de nombreux comportements sociaux.

Actuellement, des traitements à l'OT sont essayés chez l'humain pour tenter de remédier à certains déficits de comportement social, mais les mécanismes permettant des améliorations de comportement social restent totalement inexplorés. Nous nous proposons d'étudier les mécanismes d'action de l'OT chez la souris en étudiant l'impact de l'OT sur le traitement des informations auditives, plus particulièrement sur le traitement des signaux de communication acoustique.

Deux types de situations seront utilisés pour préciser le rôle de l'OT sur le traitement des signaux de communication acoustique. D'une part, nous comparerons les réponses neuronales chez des animaux vierges et chez des animaux ayant mis bas dans les jours qui précèdent et qui ont un taux d'OT élevé. D'autre part, nous comparerons les réponses neuronales chez des animaux ayant un taux plasmatique normal d'OT et chez des animaux ayant un taux plasmatique très bas en OT, à savoir une souris mutante pour un canal calcique impliqué dans la libération de l'OT.

Dans ces 2 situations, l'activité de très nombreux neurones sera enregistrée dans le cortex auditif afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Chez l'animal sous anesthésie générale profonde, les réponses électrophysiologiques de 50-70 neurones seront enregistrées lors d'une procédure sans réveil au cours de laquelle l'état physiologique sera soigneusement contrôlé. Chez l'animal vigile, nous enregistrerons par imagerie calcique non-invasive l'activité de larges populations de neurones (plusieurs centaines) et le cortex auditif d'un même animal pourra être imagé de multiple fois, ce qui limitera considérablement le nombre d'animaux (nous prévoyons l'utilisation d'un total de 521 animaux sur les 4 ans de ce projet).

Tant que possible, les procédures ont été raffinées pour permettre une meilleure prise en charge du bien-être animal : les femelles gestantes seront hébergées à plusieurs par cage afin de permettre la survie des petits lorsque les mères seront utilisées en expérimentation. Les cages d'hébergement seront aussi enrichies pour permettre la construction de nid. Les animaux expérimentés sous anesthésie générale profonde ne se réveilleront pas de leur sédation (anesthésie générale et locale en plus). Les animaux vigiles expérimentés seront surveillés tout au long de la procédure en veillant sur leur poids et leur état comportemental.

A ce stade de la recherche, il est difficile par contre de remplacer les animaux car la recherche fondamentale a besoin de structures intégrées pour nous permettre de comprendre les mécanismes. C'est grâce à cela que de futures recherches pourront développer des traitements pouvant être plus facilement discriminés sur des tapis cellulaires.

Ce projet permettra donc de comprendre les mécanismes cellulaires qui permettent à l'OT de moduler la perception de stimuli naturels signifiants (cris de nouveau-nés). Cela amènera des informations

cruciales sur les phénomènes de plasticité qui se produisent dans le cortex auditif et permettre la mise en place précoce des relations mère-nouveau-nés.

**8985** L'hépatite delta est la forme la moins fréquente des hépatites virales chroniques mais une des plus sévères. Le pathogène responsable est le virus de l'hépatite D (HDV), un virus défectif qui nécessite la présence simultanée d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour sa propagation. Même si la prévalence du HDV avait diminué dans les pays occidentaux au début des années 1990, suite à l'introduction de la vaccination contre le HBV et à d'autres mesures de prévention, on observe depuis plusieurs années une recrudescence des hépatites liées au HDV. Le HDV est un virus à ARN, et il s'agit d'un agent défectif dont la réplication a lieu indépendamment du HBV mais qui nécessite néanmoins l'expression des protéines d'enveloppe du HBV pour l'assemblage des virions HDV nécessaires à la propagation. Une infection par le HDV est donc observée uniquement chez les individus qui sont simultanément infectés par le HBV. On estime que globalement 5 à 10% des porteurs du HBV sont co-infectés par le HDV ; c'est-à-dire 15-20 millions de personnes dans le monde.

L'infection par le virus de la dengue (DENV) provoque plus de 500 000 cas par an, pour lesquelles l'hospitalisation est nécessaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement contre ce virus et aucun vaccin n'est encore autorisé. Le virus de la dengue infecte, initialement, les cellules résidentes de la peau, puis se propage dans le reste de l'organisme. Les types de cellules infectées sont nombreux. Comme le HBV, le virus de la dengue produit énormément de particules virales « vides », dépourvues de génome viral. Ces SVPs (subviral particules) servent entre autre de leurre pour le système immunitaire, détournant ainsi les défenses de l'hôte sur ces particules vides non infectieuses, permettant aux « réelles » particules infectieuses d'aller se propager.

L'infection par le virus de l'hépatite C touche environ 170 millions de personnes dans le monde. La majorité de ces infections évoluent en infections chroniques qui peuvent causer des hépatites chroniques, cirrhose et hépatocarcinome. Actuellement il n'y a toujours pas de vaccin disponible mais de nouveaux médicaments sont mis sur le marché. Les nouveaux traitements ont permis d'atteindre des réponses virologiques prolongées allant de 60 à 80%, même pour des infections par le virus de l'hépatite C (HCV) de génotype 1 qui est la plus fréquente et la plus difficile à traiter

Le HDV, virus satellite, a besoin uniquement des protéines d'enveloppe du HBV pour former la particule virale. Cependant, ce virus HDV pourrait utiliser d'autres virus comme « outil », fournisseur de protéines d'enveloppe dont il est dépourvu et qui lui sont indispensables pour se propager.

Ce projet vise à déterminer si le HDV peut en effet utiliser le HCV mais aussi le virus de la dengue comme virus auxiliaire et à mieux comprendre comment ce virus « parasite » usurpe les autres virus pour se propager. Nous souhaitons confirmer des résultats obtenus in vitro, qui ne permettent pas de valider ces mécanismes de co-infection en tenant compte des multi-paramètres tels que dissémination, différents types cellulaires impliqués etc. Il est important de vérifier dans des modèles murins infectieux, reflétant le tropisme de chacun des virus et les disséminations in vivo, afin de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage du VHD, les co-infections.

Deux modèles murins seront utilisés pour mieux comprendre les mécanismes de co-infection :

a) Un modèle de souris, dites chimériques, dont le foie est constitué d'hépatocytes murins et humains. Ces souris peuvent être infectées par les virus humains hépatotropes, HDV, HCV et HBV (qui n'infectent pas les cellules de foie murines).

b) Le second modèle murin utilisé est déficient pour certains éléments de la réponse immunitaire innée, permettant de développer une infection par la dengue.

En terme de retombées scientifiques, ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes de co-infection.

Ce projet a été dessiné en 3 procédures, le nombre de souris utilisé dans chacune des procédures sera réduit à son minimum sans pour autant compromettre les objectifs du projet ni les interprétations statistiques des résultats. Le nombre maximal d'animaux est estimé à 434 souris.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique). Un suivi adapté des animaux et la définition de points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'un mal être permettent de limiter au maximum toute souffrance animale.

**8986** Les cellules souches neurales persistent dans le cerveau adulte des Vertébrés. Elles sont localisées à proximité des ventricules et sont dotées d'un cil primaire. Afin d'exploiter ces cellules dans des thérapies cellulaires et comprendre pourquoi leur dérèglement est à l'origine de certains cancers, il est crucial de mieux comprendre comment elles intègrent les informations de l'environnement. Nous avons montré que le cil primaire joue le rôle d'antenne régulant la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Notre objectif consiste donc à utiliser une approche multidisciplinaire in vivo et in vitro afin de déterminer précisément les mécanismes intracellulaires impliqués dans ces régulations.

Ce projet original devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui régulent la neurogenèse et ainsi permettre à terme d'utiliser les cellules souches neurales dans des stratégies neurorégénératives.

Le modèle animal utilisé est la souris afin d'être dans la continuité des études antérieures et aussi afin d'utiliser les outils génétiques déjà disponibles au laboratoire.

Conformément à la réglementation, nous respecterons la règle des 3R. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, les cultures primaires ou d'explants que nous utilisons permettront de diminuer considérablement le nombre d'animaux utilisés puisqu'une seule souris permet de réaliser plusieurs essais. Afin de raffiner les expérimentations, nous réduirons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettrons en œuvre sont bien établies et n'induisent pas de douleur, d'angoisse ou de stress, et nous appliquerons des soins pré- et post-opératoires quand cela sera utile. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent et l'environnement enrichi afin de limiter le stress des souris. Enfin, il n'existe pas de méthode alternative fiable pour remplacer les cultures primaires de cellules ou d'explants pour étudier la fonction des cils, mais nous sommes vigilants et nous le resterons quant aux développements de telles méthodes.

Nous prévoyons d'utiliser environ 3000 souris pendant les cinq années de ce projet.

**8987** Les Troubles du Spectre Autistique (TSA) sont un ensemble de maladies liées à des anomalies du développement cérébral, dont les causes demeurent toujours inconnues. Le diagnostic repose sur l'examen clinique et est complexifié par l'hétérogénéité de la maladie. Il y a donc un besoin important de biomarqueurs pour aider dans le diagnostic des TSAs.

Dans une précédente étude, nous avons montré dans un modèle animal de TSA (exposition prénatale à l'acide valproïque) des anomalies du métabolisme cérébral de deux acides aminés (arginine et proline) chez la progéniture mâle au 21<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> jour de vie postnatale (P21, P35).

Le premier objectif de ce projet est de voir si le métabolisme de ces acides aminés est aussi perturbé plus précocement (P0, P7 et P14), et de voir si des biomarqueurs périphériques peuvent être associés au phénotype des animaux

De plus, des études récentes suggèrent qu'une altération du microbiote intestinal pourrait être impliquée dans la physiopathologie des TSAs. Le microbiote intestinal est de nos jours considéré comme un organe fonctionnel jouant un rôle déterminant dans la régulation de l'axe cerveau-intestin, et plus d'un quart des patients TSA présentent des troubles digestifs. De récentes études ont montré des modifications du microbiote intestinal chez des patients atteints de TSA, mais également chez des rongeurs exposés en prénatal à l'acide valproïque.

Un second objectif sera de tester l'hypothèse que les anomalies de microbiote des petits sont la conséquence de modifications du microbiote intestinal chez la mère exposée à l'acide valproïque.

Un troisième objectif sera de déterminer si une greffe de microbiote intestinal peut avoir un effet sur les symptômes présents dans ce modèle de TSA.

Ce projet implique l'utilisation d'un total de 72 rates gestantes Wistar (36 exposées à l'acide valproïque en intrapéritonéal au 12<sup>ème</sup> jour de gestation, et 36 au sérum physiologique, véhicule de l'acide valproïque), soit au moins 216 rats mâles et 216 rats femelles, l'unité statistique pour des études d'effets d'exposition prénatale étant la portée.

Remplacement : ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative in vitro ou sur cellules, la difficulté étant de modéliser une pathologie humaine neurodéveloppementale relativement hétérogène.

Raffinement : Les mères gestantes seront en présence d'enrichissement (Sizzle Nest).

Les petits issus des portées seront hébergés en groupe sociaux avec présence d'un enrichissement (tunnel et feuille de sopalin).

Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soin seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

Réduction : un maximum d'études différentes sera réalisé sur le même animal (comportement, imagerie en Tomographie par Emission de Positons (TEP), et métabolomique).

La durée de ce projet est de 3 ans.

**8988** Cette demande fait suite à deux précédents projets autorisés pour 3 ans.

Les objectifs de ce projet sont de former les étudiants de l'enseignement supérieur, dans le respect de la réglementation en vigueur, à la réalisation de projets scientifiques et l'étude de substances actives sur la pression artérielle ou le comportement, donc impossibles à tester par méthodes alternatives (remplacement). Les étudiants suivent des Unités d'enseignement de pharmacologie, de formation à la recherche des maquettes pédagogiques de :

- 4<sup>e</sup> année des études de pharmacie

- Masters

Les gestes techniques d'implantation de cathéters vasculaires sont réalisés préalablement par un enseignant-chercheur autorisé pour chirurgie qui prépare les animaux. Chaque groupe de 6 étudiants maximum (encadré par un enseignant-chercheur autorisé) travaille sur 6 à 9 animaux maximum. Les étudiants planifient et réalisent les expériences, sous surveillance de l'enseignant-chercheur qui vérifie les doses, les volumes et fréquences de prélèvement sanguin selon le poids, les méthodes d'injection, la bonne réalisation des procédures et le respect de l'éthique (raffinement). Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés (réduction), chaque animal pourra suivre en tout et au maximum 3 procédures légères (P2), espacées par une semaine minimum de repos, et deux procédures modérées (P1), espacées par une semaine de repos au minimum, ou une procédure sans réveil (P3, 4). Les animaux non mis à mort seront utilisés après une semaine de repos minimum comme donneurs d'organes dans des projets de recherche. Les formations concernent :

Effets de substances pharmacologiques à visée cardiovasculaire administrées par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale chez le rat éveillé

- préhension, pesée, injections sous-cutanée ou intrapéritonéale de liquide physiologique stérile ou de substances pharmacologiques diurétiques, mesure de la pression artérielle mesurée avec un manchon à la queue et mesure et recueil des urines pour dosages, après mise en cage métabolique maximum 24h (P1)

Effets de substances psychotropes chez le rat éveillé, administration sous-cutanée ou intrapéritonéale

- préhension, pesée, injections sous-cutanée ou intrapéritonéale de liquide physiologique stérile ou de substances pharmacologiques (substances anxiolytiques, neuroleptiques ou stimulantes) et mesure de l'activité motrice et de la capacité d'exploration (P2)

Effets sur la pression artérielle de substances pharmacologiques à visée cardiovasculaire administrées par voie intraveineuse, cathéters vasculaires préalablement implantés et maintien de l'anesthésie gazeuse par l'enseignant chercheur, chez le rat anesthésié (P3), sans réveil.

Prélèvements sanguins pour dosage de substance ou de marqueurs biologiques dans le sang après administration intraveineuse ou sous-cutanée de substances pharmacologiques, cathéters vasculaires préalablement implantés et maintien de l'anesthésie gazeuse par l'enseignant chercheur, chez le rat anesthésié (P4), sans réveil.

Le nombre total de rats dépend du nombre de sous-groupes d'étudiants - en se basant sur 2016-2017 et 2017-2018 (114 rats en tout, dont 42 sans réveil, 24 pression artérielle à la queue + cages métaboliques, 48 psychotropes), un total de 300 rats maximum pour 5 ans seront concernés

4<sup>e</sup>ème année pharmacie : substances cardiovasculaires, psychotropes – 20-25 rats/ an

Masters : substances cardiovasculaires, psychotropes – 30-40 rats/ an

**8989** Les événements cardiovasculaires en lien avec un athérome accéléré sont la première cause de mortalité des sujets ayant un lupus érythémateux systémique. Cette mortalité cardiovasculaire n'est

pas expliquée par les seuls facteurs de risque cardio-vasculaires classiques et certains acteurs clés de l'immunopathogénèse du lupus semblent contribuer à ce sur-risque cardiovasculaire.

Les lymphocytes B jouent un rôle causal dans la pathogénie lupique. La déplétion in vivo des lymphocytes B chez la souris lupique prévient le développement de la maladie. Un anticorps monoclonal ciblant BAFF, molécule indispensable à la survie des lymphocytes B, a obtenu récemment une autorisation de mise sur le marché dans le lupus en France.

De façon intéressante, plusieurs travaux montrent également le rôle athéroprotecteur chez la souris des thérapies monoclonales ciblant les lymphocytes B ou de l'inactivation génétique du récepteur pour BAFF.

Nous faisons l'hypothèse que le lymphocyte B est un acteur clé de l'athérome accéléré associé au lupus.

L'objectif du présent projet est de

1. Développer un modèle murin lupus/athérome par injection d'adjuvant capable d'induire un lupus (pristane) chez des souris développant de façon constitutionnelle une maladie atheromateuse
2. Montrer que les lymphocytes B auto-réactifs contribuent à l'athérogenèse accélérée dans ce modèle murin par des tests in vitro
3. Montrer qu'un anticorps monoclonal ciblant BAFF a une efficacité thérapeutique sur la maladie lupique et le développement de l'athérome par injection chez nos souris lupus/athérome définies en 1, un anticorps anti-BAFF (ou témoin isotypique) capable de dépléter les populations lymphocytaires B.

Les procédures se feront dans le respect de la règle des 3R : i/ le nombre d'animaux par groupe a été calculé sur la base de la variabilité observée sur le développement des lésions athéromateuses aortiques chez la souris : nous utiliserons 15 animaux/groupe. Au total, 180 souris seront utilisées; ii/ les souris sont surveillées de façon journalière et seront gardées sans isolement et avec enrichissement. Le phénotype des lignées murines utilisées est non dommageable. Pour chaque prélèvement sanguin, les souris sont anesthésiées et des points limites ont été fixés pour prévenir la souffrance des animaux; iii/ Le lupus et l'athérome sont 2 pathologies complexes pour lesquelles il n'existe pas de modèle in vitro. Il est néanmoins indispensable d'avoir des données préliminaires dans un modèle animal car ce projet s'inscrit dans une perspective de développement clinique chez l'homme.

**8990** Les maladies pulmonaires comme l'emphysème, la fibrose ou l'hypertension artérielle pulmonaire touchent de très nombreux patients dans les pays industrialisés. L'apparition de ces maladies est favorisée principalement par le tabagisme ou la pollution. On observe chez ces patients un vieillissement prématuré des poumons qui présentent alors des similarités avec les poumons de patients âgés. Entre autres, l'une des spécificités de ces poumons est qu'ils contiennent un très grand nombre de cellules dites sénescents. Ce sont des cellules qui cessent de proliférer, restent présentes dans l'organisme et sécrètent de nombreux facteurs pouvant être délétères pour le poumon. Notre laboratoire cherche à déterminer le lien entre l'apparition de ces maladies pulmonaires et la présence de cellules sénescents. L'objectif sous-jacent étant de mieux caractériser l'apparition de ces maladies afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au cours de cette étude, nous cherchons à déterminer si la présence de ces cellules sénescents dans le poumon peut être un facteur causal ou une simple conséquence des maladies pulmonaires. Nous allons utiliser un modèle de maladies pulmonaires chez la souris par exposition à la fumée de cigarettes pendant plusieurs mois. Un groupe de souris sera utilisé pour quantifier les cellules sénescents dans le poumon au cours de l'étude. Dans un deuxième groupe, nous induirons génétiquement la sénescence pulmonaire afin d'observer si cela est associé à une augmentation de la sévérité des maladies. Dans un troisième groupe, nous supprimerons l'apparition de cellules sénescents afin de mesurer si cela permet de limiter l'apparition et l'évolution des maladies pulmonaires dans notre modèle. Toutes ces souris seront comparées à des souris laissées en conditions normales, c'est-à-dire sans avoir été exposées à la fumée de cigarettes. Dans cette étude, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux (300 souris au total) notamment en utilisant des techniques novatrices telles que l'imagerie. Par ailleurs la méthodologie est raffinée en enrichissant l'environnement des souris et en mettant en place un arrêt des procédures en cas de souffrance de

l'animale. De plus, une partie de notre travail de recherche a lieu sur des cellules en culture lorsque c'est possible, afin de remplacer les animaux. Nous respectons donc l'objectif de réduction, raffinement et remplacement.

**8991** La fièvre aide à combattre les infections, notamment via l'activation du système immunitaire. L'inflammation locale est également accompagnée de chaleur, mais comment la chaleur est produite localement, et si cette chaleur locale affecte la réponse immunitaire, en particulier la réponse immunitaire humorale (médiée par les lymphocytes B), restent mal connus. Notre hypothèse est que, lors d'une réponse immunitaire, la chaleur est produite non seulement par vasodilatation des vaisseaux sanguins, mais également par induction locale de thermogénèse. Ce mécanisme pourrait influencer la mise en place de la réponse immunitaire adaptative dans les organes lymphoïdes secondaires lors des réponses immunitaires aiguës comme les infections, mais également aux sites d'inflammation chronique dans lesquels des centres germinatifs ectopiques se développent, comme la paroi des aortes athérosclérotiques, la muqueuse intestinale dans la maladie de Crohn, ou la paroi des vaisseaux dans le rejet de greffe.

Nous souhaitons ici prouver que de la chaleur est produite localement par thermogénèse en réponse à différents stimuli inflammatoires par des techniques d'imagerie préclinique, en comparant la réponse de souris normales et de souris transgéniques incapables de faire de la thermogénèse, et d'étudier la réponse humorale induite. Nos résultats pourraient avoir un impact diagnostique chez les patients dans des pathologies infectieuses mais également d'inflammation chronique, en permettant de détecter des foyers d'inflammation actifs.

Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 80 animaux, pour une durée de 3 ans, en respectant le principe des 3R. Ce nombre d'animal nous permettra de tester l'effet de différents stimuli inflammatoires sur la production de chaleur chez des souris normales et des souris incapables de faire de la thermogénèse. Remplacement : La compréhension des mécanismes étudiés nécessite une approche in vivo chez l'animal. En effet, le contrôle de la température fait intervenir de nombreux partenaires cellulaires et ne peut donc se faire que sur organismes vivants, ayant une physiologie et un système immunitaire proche de l'homme. Il est donc impossible de remplacer l'étude chez les souris par des modèles in vitro. Réduction : Des études longitudinales sur les mêmes animaux, ainsi que l'utilisation de contrôles internes à chaque souris (comparaison dans une même souris de la température dans le site drainant le site d'immunisation et dans un site contrôle), permettront de diminuer le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : Les modèles transgéniques choisis ont des phénotypes non dommageables. Le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement, avec une surveillance scrupuleuse de l'état de santé des souris par les opérateurs et les responsables du bien-être animal en plus des soins standards. Les immunisations sont réalisées sous anesthésie. L'imagerie est réalisée sous anesthésie, avec confort thermique et contrôle du rythme respiratoire et de la température de l'animal.

**8992** L'élevage est aujourd'hui remis en question pour ses impacts négatifs sur l'environnement et la compétition avec l'alimentation humaine qu'il occasionne. Les scénarii les plus récents proposent de ne nourrir les ruminants qu'à partir de surfaces non arables. Dans cette perspective, les systèmes herbagers apparaissent de plus en plus comme les options d'avenir les plus solides pour l'élevage des ruminants, permettant de concilier production, revenu agricole, large bouquet de services écosystémiques et produits de bonne qualité nutritionnelle. Si de nombreux travaux scientifiques ont d'ores et déjà démontré les bénéfices de ces systèmes, en particulier du pâturage des prairies permanentes, il existe toujours des zones d'ombre pour comprendre tous les mécanismes à l'œuvre depuis la prairie jusqu'au produit.

Ce projet propose d'étudier l'effet de la diversité botanique des prairies sur le microbiote du rumen qui, de manière indirecte, peut modifier celui du lait. Nous faisons l'hypothèse que plus la prairie sera riche en espèces végétales, notamment en dicotylédones, et plus le rumen présentera une abondance et une diversité élevée d'espèces microbiennes (bactéries, archées, champignons et protozoaires), favorables au bon fonctionnement du rumen et en conséquence ayant un impact positif sur l'état sanitaire et le bien-être des animaux et sur la qualité sanitaire et nutritionnelle des produits laitiers. Des travaux ont déjà démontré les effets de certaines plantes sur le microbiote du rumen. Ici,



il s'agit d'avoir une vision plus systémique en abordant la question à l'échelle de la communauté végétale de la prairie et en s'intéressant à ses effets en cascade sur les communautés microbiennes du rumen, des fèces, de la surface des trayons et du lait. En effet, le microbiote présent à la surface des trayons est le principal réservoir pour la flore du lait cru. Ce dernier est susceptible d'exercer un effet barrière sur le développement des germes pathogènes et elle a un effet bénéfique sur les qualités sensorielles des fromages au lait cru.

S'il est impossible de remplacer l'animal dans cet essai, l'ensemble du projet a été réfléchi de manière à respecter au mieux le principe des 3R. En raison de la grande variabilité individuelle qui existe au niveau de l'écosystème microbien du rumen, nous prévoyons d'utiliser 2 lots de 8 vaches laitières primipares pendant une période de 3 mois. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour permettre l'obtention de résultats statistiquement valables. Des prélèvements de jus de rumen seront réalisés, répétés 3 fois à 6 semaines d'intervalle (3 mois au total), lorsque 1/ tous les animaux reçoivent une ration hivernale à base de foin, 2/ sont conduits sur un même pâturage et enfin 3/ lorsqu'ils pâturent une prairie permanente très diversifiée (8 vaches) ou une prairie temporaire (8 vaches). Des périodes de 6 semaines entre les prélèvements sont nécessaires pour que les écosystèmes microbiens des différents milieux prélevés se stabilisent suite aux changements d'alimentation. Aucune douleur ni souffrance n'est attendue lors de cette procédure. La contention physique des animaux s'effectuera dans les conditions habituelles d'élevage. La procédure de prélèvement utilisée permet un raffinement optimal des conditions d'expérimentation pour l'animal. Ces prélèvements permettront de mettre en relation les écosystèmes microbiens du rumen avec ceux des aliments, des fèces, des zones de couchage, de la surface de la mamelle et du lait.

**8993** La mammite, inflammation de la glande mammaire, résulte principalement d'une infection bactérienne. Elle représente l'une des raisons les plus fréquentes de recours à l'antibiothérapie chez la vache laitière. En raison des contraintes qui visent à diminuer l'utilisation des antibiotiques et de la demande pressante des consommateurs pour des produits plus sûrs et plus naturels, il devient essentiel de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections de la mamelle. Ainsi, le présent projet vise à étudier les effets immunomodulateurs des  $\beta$ -glucanes et d'évaluer comment ces molécules pourraient améliorer la résistance des ruminants laitiers aux infections mammaires et par conséquent leur santé et leur bien-être. Les  $\beta$ -glucanes proviennent de diverses sources naturelles dont la levure. Plusieurs études ont déjà rapporté les effets bénéfiques des  $\beta$ -glucanes sur la santé dont l'amélioration des performances immunitaires permettant d'accroître la résistance individuelle aux infections de façon non spécifique, les capacités de régénération tissulaire ou encore l'immunité, principalement les fonctions phagocytaires, l'amélioration de la résistance des individus aux infections, la guérison des plaies ou même la promotion d'activités anti-tumorales. Nous nous concentrerons sur les  $\beta$  (1-3, 1-6) glucanes ramifiés présents dans la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, levure de boulangerie.

Très peu de données sont disponibles sur les effets des  $\beta$ -glucanes sur la physiologie du ruminant d'élevage. Notre projet doit apporter une preuve de concept avant d'envisager l'utilisation de  $\beta$ -glucanes pour limiter l'incidence de la mammite dans les exploitations agricoles.

En l'absence de modèle *in vitro* validé pour l'objectif de l'étude, le recours à des animaux est nécessaire. L'essai sera réalisé sur 18 vaches laitières gravides de race Prim'Holstein en milieu de lactation dont 10 déjà porteuses d'une canule au niveau ruminal. Après 21 jours de distribution de parois de levures à 9 d'entre-elles, les 18 vaches recevront une infusion intra-mammaire de lipopolysaccharide (LPS) ultra-pur d'*Escherichia coli* (O111 : B4) dans un des quatre quartiers du pis. L'administration de LPS permet de simuler, pour part, la pénétration dans la glande d'une bactérie Gram négatif et de récapituler les principales étapes de la réaction inflammatoire qui y est associée tout en préservant le statut sanitaire des animaux et des installations. Un nombre de 18 vaches est nécessaire afin de produire un jeu de données exploitable du point de vue statistique (tests non-paramétriques). Afin de mesurer les paramètres physico-chimiques, microbiologiques et fermentaires du métabolisme du rumen, les prélèvements de liquide ruminal seront réalisés uniquement via la canule. Des prélèvements ponctuels de sang seront aussi effectués pour évaluer l'évolution de l'état immunitaire et inflammatoire de l'animal : 21, 14, 7 jours avant l'administration du LPS puis toutes les 12h pendant 48h. Les animaux seront logés dans une installation agréée pour l'expérimentation, afin

de leur assurer des conditions de confort et de bien-être. L'étable est munie d'une ventilation dynamique, les vaches disposent de tapis afin de leur assurer des conditions de confort et de bien-être pendant toute la durée du projet. Par ailleurs, une surveillance biquotidienne des animaux est mise en place pendant toute la durée du projet. Les animaux sont gardés en vie à la fin de l'expérimentation et poursuivront leur carrière de vache laitière.

**8994** L'hyperactivité vésicale est un trouble urologique chronique redéfinie par l'International Continence Society en 2002 comme un syndrome clinique nécessitant au moins l'existence d'une urgenterie mictionnelle (besoin soudain d'uriner qui est, incontrôlable et difficile à retarder) associée ou non à une incontinence et généralement associée à des contractions involontaires du muscle lisse de la vessie, le détrusor.

Quand on souffre d'hyperactivité vésicale, le détrusor, se contracte de façon involontaire même lorsque la vessie n'est pas encore pleine, ce qui provoque une envie soudaine et parfois extrêmement pressante d'uriner.

Les principaux symptômes de l'hyperactivité vésicale sont donc : une urgenterie mictionnelle, une fréquence mictionnelle augmentée (besoin d'uriner au moins huit fois pendant la journée), une nycturie (se réveiller plus de deux fois pendant la nuit pour uriner) et une incontinence urinaire (fuites urinaires involontaires). Le syndrome de la vessie hyperactive entraîne au quotidien des problèmes : besoin d'avoir des toilettes à proximité en permanence pouvant conduire au refus de sortir, fuites urinaires... pouvant créer un handicap aussi bien au niveau personnel que professionnel. Ainsi, l'hyperactivité vésicale peut affecter sérieusement la qualité de vie de nombreux patients.

En Europe comme aux Etats-Unis, on estime que l'hyperactivité vésicale affecte environ 16% de la population, dont un tiers (principalement des femmes) présentent également une incontinence urinaire. De plus, les traitements de première intention n'apportent pas toujours de résultats satisfaisants. C'est pourquoi différents modèles expérimentaux sont développés dont un modèle d'irritation vésicale obtenu par l'instillation intravésicale de prostaglandine (PGE2) chez le rongeur éveillé provoquant une hyperactivité vésicale

Ainsi, l'objectif de cette étude est dans un premier temps de développer au sein de la société un modèle de vessie hyperactive par l'installation intravésicale de PGE2 chez le rat éveillé afin d'évaluer dans un deuxième temps l'effet de candidats médicaments sur les modifications de la fonction vésicale dans ce modèle.

Actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant l'étude de l'hyperactivité vésicale dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Un suivi journalier des animaux sera effectué par les zootechniciens y compris les week-ends. Si au cours de la période de traitement chronique, les animaux montraient un comportement atypique (comportement douloureux (prostration, étirement, crampes abdominales,...), cavité abdominale gonflée, perte de poids élevée (inférieure à 20%),...) ils seraient placés en cage individuelle. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas et qu'aucune solution (réhydratation, accès facilité à la nourriture) ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 42 rats pour le développement de ce modèle (décrit dans la littérature) et de 700 pour tester les candidats médicaments (14 animaux par groupe pour en obtenir 12).

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). Cette 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).

De plus ce projet devra subir une évaluation rétrospective étant donné qu'une des procédures est classée en sévère.

**8995** Ce projet participe à l'enjeu de réduction des rejets azotés dans l'environnement et à l'augmentation de l'autonomie protéique de l'élevage de vaches laitières pour limiter la concurrence avec

l'alimentation humaine. Ces deux enjeux passent par une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'apport azoté des rations pour l'animal (rapport entre l'azote exporté dans les protéines du lait et l'azote ingéré). Pour augmenter l'efficacité et l'autonomie protéique des rations, il s'agit de réduire l'apport azoté total des rations tout en maintenant la production de protéines dans le lait qui sont considérées comme des protéines idéales pour l'alimentation humaine. Les protéines du lait comme toutes les protéines sont constituées d'acides aminés porteurs d'azote. Les excédents d'acides aminés non utilisés pour la production de protéines par l'animal se retrouvent dans les urines sous forme d'urée. Or l'azote urinaire représente la forme la plus polluante d'azote rejeté dans l'environnement. L'optimisation de l'apport dans les rations en certains acides aminés digestibles dans l'intestin peut réduire cette forme de pollution. Il a été démontré que 4 acides aminés indispensables (que l'animal ne peut pas synthétiser : Lysine, Méthionine, Histidine et Leucine) sont particulièrement limitants dans les rations de vaches laitières. Leur apport permet d'augmenter l'efficacité azotée des rations. En effet, un bon équilibre en ces 4 acides aminés indispensables stimule la production de protéines du lait. L'efficacité d'utilisation des acides aminés dépend aussi fortement de l'apport d'énergie : la production de protéines étant très consommatrice d'énergie. Des connaissances manquent sur l'utilisation de ces acides aminés en fonction de l'apport d'énergie. Ces connaissances sont nécessaires pour améliorer le volet sur les recommandations en acides aminés du système d'alimentation des vaches laitières.

Pour cela, un essai étudiant l'effet de 2 profils en acides aminés (2 équilibres entre lysine, méthionine vs. histidine et leucine) couplés à 3 niveaux d'apports d'énergie sera mis en place. Six vaches laitières seront utilisées pendant 6 périodes et recevront les 6 traitements différents. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans le projet (en accord avec la règle des 3R « Réduire »), un schéma expérimental en carré Latin sera mis en place. L'intérêt d'un tel schéma est que chaque animal est son propre témoin, ce qui augmente fortement la puissance statistique et permet de réduire le nombre d'animaux par 5 (30 vaches dans un schéma expérimental longitudinal). Un test in vitro ne peut remplacer la mesure in vivo de la répartition d'utilisation des acides aminés entre la glande mammaire et les autres tissus, répartition qui caractérise l'efficacité. Pour répondre à la règle des 3R « raffiner », une grille de suivi comportemental sera utilisée pour adapter l'analgésie à chaque individu dans la phase chirurgicale de préparation des animaux. Des cathéters seront posés pour ne pas perturber les animaux lors des prélèvements sanguins en cinétique. De plus, ces animaux feront l'objet d'une surveillance biquotidienne et d'un suivi vétérinaire tout au long de l'essai. Les 6 vaches seront logées en stabulation dans la même salle afin de pouvoir se sentir et se voir. Elles seront traitées deux fois par jour comme cela est pratiqué en élevage.

**8996** Le syndrome néphrotique, caractérisé par une protéinurie massive, est causé par un large groupe de maladies dont la néphropathie glomérulaire et la glomérulosclérose segmentaire et focale. Bien que les mécanismes d'action commencent à être connus, le traitement n'est toujours pas spécifique à ce jour et est loin d'être suffisamment efficace. Il est donc important de tester de nouvelles molécules thérapeutiques pour leur efficacité sur la protéinurie induite par le développement d'un modèle de néphrite passive de Heymann, un modèle expérimental de néphropathie glomérulaire.

L'étude sera réalisée en 2 étapes :

- Une première étape de mise au point du modèle : la néphrite passive de Heymann sera induite par administration intraveineuse de trois différentes doses d'un anticorps induisant la pathologie à des rats mâles. L'albumine et la créatinine seront mesurées dans des échantillons urinaires collectés une fois par semaine pendant 6 semaines. L'urine des animaux sera également collectée pendant 24h avant sacrifice. Pour cela les animaux seront placés dans des cages métaboliques. La créatinine sera également mesurée dans des échantillons de sang collectés au moment du sacrifice des animaux.

- Une deuxième étape d'évaluation de l'efficacité thérapeutique sur la protéinurie d'une molécule ciblée : le modèle de néphrite passive de Heymann sera induit sur des rats mâles selon la méthode ayant donné les meilleurs résultats dans la première étape ; puis la molécule thérapeutique à tester sera administrée à 2 doses différentes, quotidiennement par voie orale pendant 28 jours (du jour 15 au jour 42). Un groupe d'animaux sera également inclus pour comparer l'efficacité du traitement à un contrôle positif. Ce contrôle positif sera administré à l'aide d'une pompe osmotique implantée en sous-cutané au jour 15. L'albumine et la créatinine seront mesurées dans des échantillons urinaires

collectés une fois par semaine pendant 6 semaines. L'urine des animaux sera également collectée pendant 24h avant sacrifice. Pour cela les animaux seront placés dans des cages métaboliques. La créatinine sera également mesurée dans des échantillons de sang collectés au moment du sacrifice des animaux.

Le nombre de rats nécessaire à cette étude est de 63 comprenant la mise au point du modèle sur 27 animaux et l'évaluation du candidat médicament sur 36 animaux (à raison de 9 animaux par groupe ce qui est le minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs, sur 3 ou 4 groupes respectivement pour chaque étape).

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 (tunnels en polycarbonate, aspen brick). L'utilisation de cages à métabolisme pour les récoltes urinaires nous permettra de mesurer la fonction rénale sans recours au sacrifice des animaux à différents temps. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

**8997** Notre projet de recherche vise à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le carcinome hépatocellulaire, le principal cancer primitif du foie. Ce cancer est la deuxième cause de décès liée au cancer dans le monde, et son incidence est en augmentation, en partie du fait des nouvelles habitudes alimentaires menant au surpoids. Le mauvais pronostic vital des patients atteints de carcinome hépatocellulaire est du notamment à une absence d'approche thérapeutique satisfaisante autre que la chirurgie. Une raison importante de cette absence de traitement est la mauvaise caractérisation des événements oncogéniques menant au cancer. Il est donc essentiel de poursuivre des travaux de recherche afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse hépatique. Dans cette optique, l'utilisation de modèles animaux, en l'occurrence la souris, est une étape indispensable pour valider les résultats préliminaires obtenus *ex vivo*.

Notre objectif est de caractériser les coopérations oncogéniques en jeu dans le carcinome hépatocellulaire.

**REMPACER** : Nous avons étudié dans un premier temps ces interactions en utilisant des modèles de lignées cellulaires hépatiques. Cependant, ces modèles présentent des limitations importantes, et il est maintenant nécessaire d'étendre ces travaux *in vivo*. Il n'existe pas d'autre alternative que l'utilisation d'un modèle animal de la pathologie humaine. Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, le modèle animal utilisé par la communauté scientifique et médicale est la souris, *mus musculus*. En se basant sur un modèle de transfection des hépatocytes *in vivo* de souris transgéniques ou contrôle, notre projet prévoit d'étudier 4 combinaisons d'oncogènes dont la coopération semble être déterminante dans la carcinogenèse hépatique chez l'homme. Nous déterminerons quelles combinaisons d'oncogènes donnent lieu à des tumeurs et procéderons à l'analyse moléculaire de ces tumeurs et des modifications de l'environnement engendrées dans le reste du foie (microenvironnement tumoral). Les résultats obtenus seront renforcés par des expériences classiques de xénogreffe tumorale chez des souris immunodéprimées (Nude).

**REDUIRE** : Nous avons effectué avec le service de statistiques de notre institut les calculs permettant de déterminer qu'un nombre de 200 souris est le nombre minimum afin de mener à bien l'étude sans altérer son résultat.

**RAFFINER** : Toutes les dispositions ont été prises afin raffiner (Raffinement) les conditions d'élevage et d'expérimentation. Notamment, il existe sur l'animalerie un comité local de bien-être animal (CBA). Le bien-être animal est évalué quotidiennement. Les procédures expérimentales sont très bien définies et ont été publiées. Les points limites sont déterminés, aucune dérogation n'est nécessaire et nous ne prévoyons pas de souffrance animale. Une attention particulière est portée à la préparation pré-opératoire et à la formation de l'expérimentateur afin de limiter la durée de la procédure expérimentale et ainsi réduire la douleur et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale.

Les retombées de ce projet sont importantes pour une meilleure compréhension de la pathologie humaine et la possibilité de développer un jour des approches thérapeutiques satisfaisantes.

**8998** Les cancers de l'ovaire restent particulièrement meurtriers du fait de leur capacité à développer une résistance aux chimiothérapies conventionnelles, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles de surmonter la chimiorésistance constitue un enjeu majeur pour l'amélioration de leur prise en charge.

La littérature récente a montré le rôle majeur de Mcl-1 dans la carcinogénèse d'une grande variété de localisations tumorales ce qui a progressivement conduit à la désignation de Mcl-1 comme une cible thérapeutique prioritaire. Dans le cadre d'une coopération avec un laboratoire de modélisation moléculaire et de chimie thérapeutique, nous avons ainsi démontré le potentiel d'une nouvelle catégorie de structures chimiques, comme perturbateurs des interactions protéine-protéine au sein de la famille Bcl-2, et identifié plusieurs molécules d'intérêt pour l'inhibition de Mcl-1, parmi lesquelles une molécule chef de file apparaît la plus efficace.

Néanmoins, l'inhibition seule de Mcl-1 n'induit que rarement une mort cellulaire massive et doit être associée à l'inhibition d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou bien à l'induction de facteurs pro-apoptotiques. Ainsi, il a été démontré l'intérêt de l'inhibition concomitante de Mcl-1 et Bcl-xL, une autre protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, pour induire la mort dans les cellules tumorales ovariennes réfractaires à la chimiothérapie. Par ailleurs, l'induction de facteurs pro-apoptotiques tels que Bim via l'inhibition des voies MEK ou mTOR permet de sensibiliser à des inhibiteurs de la famille Bcl-2.

Le projet présenté ici vise à évaluer *in vivo* la toxicité associée aux inhibiteurs de Mcl-1 développés dans le cadre de collaborations avec des équipes de chimistes et identifier les traitements permettant de sensibiliser les cellules tumorales ovariennes à ces inhibiteurs sur des modèles de souris. Ces modèles sont obtenus après l'injection de lignées cancéreuses ovariennes humaines en sous-cutané ou en intrapéritonéal (modèle de carcinose) ou de l'implantation de fragments de tumeurs ovariennes de patientes en sous-cutané. Ces inhibiteurs seront ainsi associés à des traitements visant à inhiber Bcl-xL (Navitoclax), Bcl-2 (Venetoclax) ou les voies mTOR (AZD8055) et MEK (Trametinib).

Le nombre de souris maximum nécessaires pour mener à bien ce projet est de 3832 sur 5 ans.

Même si le passage à l'animal est nécessaire pour répondre aux questions scientifiques posées par ce projet, un soin particulier a été porté au respect du principe de la loi des 3R, notamment par l'utilisation d'un minimum optimal d'animaux utilisés pour satisfaire aux exigences statistiques et répondre à l'objectif du projet (Réduction) et par l'utilisation de méthodes limitant la souffrance des animaux (Raffinement).

Ainsi, les protocoles de traitement seront menés avant que la taille totale des tumeurs ne puisse gêner le bien-être des animaux. D'autre part, une souffrance visible liée au développement tumoral sera considérée comme point limite, de même qu'une détresse caractérisée par une perte de poids supérieure à 15% ou une prostration de l'animal. Ces points limites donneront lieu à l'euthanasie de ces animaux au système immunitaire déficient (prérequis indispensable à l'implantation de cellules tumorales d'origine humaine). Cette euthanasie sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

**8999** En France, les productions animales sont dépendantes de l'importation de tourteaux de soja, malgré des quantités, une qualité et un prix non maîtrisés et non garantis à l'avenir. Le projet a pour objectif de définir l'utilisation digestive de différentes matières premières (par exemple graines de féverole, de lupin, de lin et de pois) chez le porc en croissance, après l'application de procédés technologiques visant à améliorer l'utilisation des nutriments pour l'animal.

Le protocole prévoit 2 essais :

- Essai 1 : pour évaluer la digestibilité de l'ensemble du tube digestif (au niveau fécal)
- Essai 2 : pour évaluer la digestibilité dans la première partie du tube digestif et jusqu'à la fin de l'intestin grêle (au niveau iléal)

La digestibilité des matières premières étudiées sera comparée à un groupe de porcs recevant un aliment standard, par calcul différentiel de l'utilisation digestive des nutriments. L'essai 1 comprendra 120 porcs en croissance, recevant chacun un régime expérimental pendant 21 jours pour la collecte totale des fèces et des urines. Dans l'essai 2, 20 porcs recevront successivement 5 régimes expérimentaux, puis un régime à très faibles teneurs en protéines et en lipides au cours de 6 périodes successives.

Le présent protocole a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux dans chaque essai et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'analyse de l'utilisation digestive chez le porc. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie chez les porcs et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Raffinement : l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digestats de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience. Afin de limiter l'hébergement en cage à digestibilité limitant les mouvements de l'animal, les animaux seront d'abord hébergés dans des cages leur permettant de se retourner. Les cages seront placées de façon à permettre un contact visuel, sonore, olfactif et tactile entre les animaux.

**9000** Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) correspondent à une interruption de l'alimentation en sang du cerveau. Ils sont la deuxième cause de morbi-mortalité et très peu de médicaments sont disponibles. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, il est important de comprendre les mécanismes de régulation de la circulation cérébrale. Lors des AVC, les vaisseaux cérébraux ont tendance à se contracter, ce qui diminue l'apport en sang et accentue les conséquences délétères de l'AVC. Les récepteurs cérébro-vasculaires à l'angiotensine II contribuent à ce phénomène. Le monoxyde d'azote (NO) produit par l'organisme ou administré comme traitement peut prévenir les phénomènes contractiles des vaisseaux. Ce NO modifie la réponse de différentes protéines (dont les récepteurs de l'angiotensine II) suite à leur « S-nitrosation » (fixation de NO sur la protéine). Cette nitrosation des protéines permet également un stockage du NO dans l'organisme (le NO étant très peu stable).

L'objectif de ce projet est d'étudier les mécanismes et les conséquences de cette nitrosation sur le fonctionnement des récepteurs de l'angiotensine II et d'autres protéines impliquées dans la contraction vasculaire. Des artères de rats seront donc exposées à un donneur de NO permettant la nitrosation (un nitrosothiol par exemple) et nous étudierons les conséquences de cette exposition sur la réponse de ces artères à différents stimuli (induisant une contraction ou une relaxation des artères). L'exposition aux donneurs de NO pourra se faire après prélèvement de l'artère (ex vivo) ou in vivo par un prétraitement des animaux avec un nitrosothiol. Pour ce prétraitement les nitrosothiols pourront être inclus ou non dans des formulations galéniques permettant une libération contrôlée et prolongée (microparticules sous-cutanées ou formulations pour voie orale). De telles formulations galéniques permettent de protéger les nitrosothiols (molécules assez fragiles) de la dégradation enzymatique, allongent leur libération et leurs effets sur 48h et atténuent leur effet indésirable (baisse de la pression artérielle). La durée des effets des nitrosothiols après prétraitement des animaux sera suivie par dosage sanguin afin d'établir la concentration optimale. Dans ce cas, des nitrosothiols contenant un isotope radiomarqué de l'Azote<sup>15</sup> seront utilisés, pour discriminer les nitrosothiols produits par l'organisme de ceux administrés.

L'étude porte sur des rats en situation physiologique ou pathologique comme l'hypertension artérielle, qui est un facteur de risque important d'AVC.

Le projet concernera :

- 192 rats (Wistar, ou Spontanément Hypertendus et leurs témoins Wistar-Kyoto) mâles adulte (3-5 mois) non traités + 192 rats (idem) prétraités avant le don de tissus utilisés comme donneurs d'artère cérébrale moyenne, anneaux aortiques, microvaisseaux cérébraux pour études de vasoactivité et dosages biochimiques ou biomoléculaires ;
- 100 rats Wistar mâles adultes prétraités par nitrosothiol marqué à l'Azote<sup>15</sup> pour prélèvement sanguin à la queue et dosages sanguins.

Les réponses de contraction ou dilatation des artères suite à un prétraitement par les nitrosothiols ne peuvent être étudiées qu'après prélèvement chez l'animal (pas de remplacement possible, sauf pour l'étude des aspects mécanistiques de S-nitrosation (internalisation des récepteurs, ...) qui seront évalués sur culture de cellules).

Toutes les procédures respecteront les règles éthiques (anesthésie/chirurgie). Les points limites post-opératoires sont définis comme suit : diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou hydrique ; perte de poids de plus de 10% en 3 jours.

Les mêmes animaux serviront pour dons d'artère cérébrale moyenne et d'aorte (Réduction), d'autres pour les microvaisseaux cérébraux. Les animaux utilisés pour dons d'artères ou microvaisseaux cérébraux serviront également pour des dons sanguins et d'intestins pour évaluer l'effet de la nitrosation sur la barrière intestinale.

Les animaux seront hébergés en portoir avec des cages ventilées et filtrées, à 3 maximum par cage, dans des cages de 1500 cm<sup>2</sup>, avec un enrichissement du milieu (tunnels polycarbonates et/ou buchettes en peuplier ; Raffinement)

**9001** A la suite d'un infarctus du cœur, la zone nécrosée ne se contracte plus et, si elle est étendue, le cœur ne peut plus délivrer assez de sang au corps, d'où apparition d'une insuffisance cardiaque. Dans les formes les plus graves, les patients relèvent d'une transplantation du cœur mais les limites de cette approche font explorer de nouvelles pistes thérapeutiques, dont la transplantation de cellules. Pendant longtemps, on a pensé que les cellules injectées dans le cœur se transformaient en nouvelles cellules cardiaques. En réalité, elles semblent principalement agir comme des « micro-usines à médicaments » sécrétant des substances qui activeraient des mécanismes de cicatrisation du cœur lui-même. Ces substances sont regroupées dans de petites particules libérées par les cellules, appelées vésicules, qui semblent être les médiateurs des effets bénéfiques des cellules greffées. Il a été précédemment montré que l'effet cardioprotecteur d'une transplantation de cellules cardiaques pouvait être reproduit, quasiment à l'identique, par la seule administration des vésicules qui en sont issues. L'objectif de ce projet est maintenant de valider ce concept sur un modèle de gros animal, préalable indispensable, pour des raisons scientifiques, éthiques et réglementaires, à un premier essai chez l'homme.

Le porc a été choisi car l'anatomie des artères coronaires dans cette espèce est proche de celle de l'homme. Dans un premier temps, un infarctus du myocarde sera créé par occlusion temporaire d'une artère coronaire par un ballon introduit par l'artère fémorale (donc sans chirurgie). Trois semaines plus tard, les vésicules incorporées dans un biomatériau (pour permettre leur libération prolongée) seront administrées sous la forme d'une solution injectable (par cathétérisme) ou d'un patch déposé sur la zone de l'infarctus (par chirurgie). Immédiatement avant l'intervention, l'état cardiaque des animaux sera évalué par imagerie par résonance magnétique et scanner afin de collecter le maximum d'informations morphologiques et fonctionnelles. Les animaux resteront ensuite à la ferme durant 3 mois, sans examen supplémentaire ni traitement. Trois mois plus tard, ces examens seront répétés afin d'évaluer les effets du traitement par les vésicules par rapport à des animaux contrôles; puis, les animaux seront sacrifiés et le cœur soumis à une série d'analyses histologiques et de biologie moléculaire pour apprécier notamment le degré de fibrose et d'angiogenèse et établir si des mécanismes cardioprotecteurs ont été activés par les vésicules. Des dosages sanguins d'un marqueur d'insuffisance cardiaque seront également pratiqués immédiatement avant le traitement et au moment du sacrifice.

Au total, 32 porcs seront utilisés dans ce projet afin d'assurer un nombre d'animaux permettant une analyse statistique fiable et robuste. Afin de réduire la douleur et la souffrance des animaux, les procédures sont réalisées sous anesthésie générale et analgésie. Des antalgiques sont prévus en post-opératoire et des points limites seront établis avec une mise à mort anticipée de l'animal en cas de douleur avérée.

**9002** Le système endocannabinoïde (EC) est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et participe au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Le fait qu'il soit profondément altéré au cours de l'obésité et que les EC soient capables de moduler la sensibilité à l'insuline des tissus et leur capacité à produire de l'énergie (captation de glucose, biogenèse mitochondriale) suggère un rôle potentiel du système endocannabinoïde dans le contrôle de l'homéostasie protéique, en particulier au niveau musculaire. Des résultats préliminaires obtenus montrent que certains agonistes/antagonistes de ce système stimulent la synthèse protéique dans un modèle de cellules musculaires in vitro.

La sarcopénie se définit comme la perte involontaire de masse, force et fonction musculaire associée au vieillissement. Sa physiopathologie est complexe et résulte de la combinaison de l'altération de différents facteurs : augmentation de la dégradation protéique, diminution de la synthèse protéique, diminution de l'activité mitochondriale musculaire et résistance aux stimuli anaboliques incluant insuline et acides aminés. La résistance aux stimuli anaboliques observée avec l'âge est encore mal comprise mais pourrait résulter d'une infiltration lipidique musculaire accrue ou d'altérations mitochondriales. Ce type d'atteintes est également couramment observé au cours de l'obésité, et cette dernière accroît la fonte musculaire au cours du vieillissement. On parle alors d'obésité sarcopénique. Dans ce contexte, le système endocannabinoïde a un rôle majeur potentiel puisqu'il contrôle le développement de l'obésité, de l'insulinorésistance et l'activité mitochondriale.

Le rôle du système endocannabinoïde tissulaire spécifique et son impact sur le métabolisme au niveau du corps entier n'a à ce jour été étudié que dans le foie et le tissu adipeux. Ainsi la délétion de CB1 (récepteur aux endocannabinoïdes) uniquement au niveau du foie protège contre la stéatose hépatique induite par un régime riche en graisses, mais n'empêche pas la prise de masse grasse et ne corrige que partiellement la mise en place de l'insulinorésistance. Dans une étude utilisant un système inductible, la délétion de CB1 uniquement au niveau du tissu adipeux est capable de protéger les souris de l'induction de l'obésité par un régime riche en graisse, et de corriger cette obésité même lorsque celle-ci est établie. A ce jour, aucune étude n'a cherché à analyser l'impact de la délétion muscle-spécifique du CB1 sur le contrôle du métabolisme au niveau du corps entier et son implication dans la mise en place des désordres métaboliques liés au développement de l'obésité et à la mise en place de la sarcopénie. Aussi, l'objectif de ce projet est de créer une souris transgénique invalidée pour le récepteur aux endocannabinoïdes CB1 uniquement au niveau musculaire.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro ou ex vivo mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Pour répondre à l'objectif de notre étude, nous utiliserons le système Cre/Lox qui consiste à croiser des souris qui expriment la recombinaise Cre (souris mck-Cre, A) uniquement au niveau musculaire à des souris où le gène CB1 est limité par des séquences LoxP (Souris CB1 LoxP, B). La recombinaise entraîne l'excision de séquences d'ADN situées entre deux sites LoxP. Les souris provenant de ce croisement exprimeront la recombinaise Cre au niveau musculaire, ce qui entraînera la délétion du gène CB1. Ainsi la souris obtenue (mCB1-KO) exprimera le récepteur CB1 dans l'ensemble des tissus à l'exception du muscle squelettique. La création des souris mCB1-KO nécessitera un total de 930 souris (obtention de lignées MCK-CRE et CB1 LoxP ayant un fond génétique pur identique, croisement pour obtention de la souris mCB1-KO et caractérisation du modèle (viabilité, reproduction...)).

**9003** La maladie de Parkinson (MP) se situe au second rang des maladies neurodégénératives les plus communes. Elle se caractérise par la dégénérescence des neurones de la substance noire, qui se projettent au striatum et sécrètent de la dopamine. Ces structures font partie des ganglions de la base, un ensemble de noyaux dans le cerveau responsables de la mémoire motrice. En effet, les symptômes majeurs de la MP incluent des troubles moteurs comme la lenteur à initier les mouvements (akinésie), la rigidité musculaire ou encore le tremblement de repos.

Nos études expérimentales récentes ont montré l'existence chez la souris d'une nouvelle sous population d'interneurones cholinergiques (ACh+) du striatum, les interneurones ACh+/Lhx6+, qui dysfonctionnent dans un modèle de la MP.

Notre objectif est de déterminer la fonction de cette nouvelle sous population d'interneurones cholinergiques dans le comportement moteur en condition saine et dans la MP. Nous allons chercher d'éventuelles modifications de comportement pendant l'exécution de tâches motrices et lors de manipulations (stimulation ou inhibition) spécifiques des interneurones d'intérêt chez des souris adultes saines et modèles de la MP. Ce projet utilisera 395 souris adultes.



Pour manipuler spécifiquement l'activité des interneurons ACh+/Lhx6+, des molécules photo-stimulables (rassemblées dans un vecteur viral) seront exprimées dans les interneurons ACh+/Lhx6+ chez des souris transgéniques (souris Cre/Flp). Puis une source de lumière (un laser dans notre cas) sera appliquée dans le striatum. Pour injecter bilatéralement les molécules photo-stimulables dans le striatum nous ferons une chirurgie qui requiert une micro-perforation du crâne et de la dure-mère pour accéder à la structure cible, puis une micro-injection du vecteur viral via une aiguille fine dans chaque hémisphère. Pour créer le modèle souris de la MP nous ferons une micro-injection unilatérale de la toxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dans un striatum lors de la même chirurgie. Finalement, toujours dans la même chirurgie et dans la même structure, une fibre optique sera implantée bilatéralement et chroniquement. Ceci permet d'illuminer bilatéralement le striatum de la souris avec un faisceau laser, et ainsi de manipuler l'activité des interneurons d'intérêt pendant les expériences de comportement.

Après récupération post-opératoire, les souris seront entraînées et testées dans des tâches motrices adaptées à leur espèce. Pour cela les animaux sont laissés libres dans le dispositif où les tests comportementaux se déroulent. Afin d'illuminer une partie du striatum, les fibres optiques implantées dans le cerveau de l'animal sont connectées au faisceau laser avant le début de l'expérience de comportement. Cette connexion est réalisée en quelques secondes et est totalement indolore pour les souris.

L'ensemble des données obtenues fournira des indices importants quant à la fonction motrice in vivo des interneurons ACh+/Lhx6+ du striatum en conditions saine et pathologique.

Concernant l'application des 3Rs, le laboratoire a déjà mené des études in vitro et a démontré la possible implication des interneurons ACh+/Lhx6+ dans les symptômes moteurs de la MP, cependant il reste à confirmer ces résultats in vivo. Nous analyserons nos données au fur et à mesure des expériences, pour éviter des expériences inutiles et les mêmes animaux seront testés pour différentes conditions afin d'en minimiser le nombre. Les animaux seront hébergés dans des cages standards enrichies (ex. tunnels), et dans un environnement contrôlé avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Avant toute chirurgie ou manipulation douloureuse, une combinaison d'anesthésique et sédatif sera administrée, ainsi qu'un analgésique. En post-opératoire, les souris auront au moins une semaine pour se rétablir. Pendant la chirurgie et tout au long des expériences, leurs paramètres comportementaux et physiologiques seront observés attentivement. Finalement, pour soulager le stress pendant les expériences, les animaux seront d'abord familiarisés avec l'expérimentateur et habitués à la salle de comportement.

**9004** La transplantation rénale représente une procédure chirurgicale de plus en plus utilisée pour le remplacement d'organe chez le patient atteint d'insuffisance rénale. Cette thérapie de remplacement est résolutive à condition que le rein transplanté reprenne une fonction physiologiquement normale rapidement après la greffe.

L'ischémie reperfusion (IR) rénale est un phénomène inévitable pendant la transplantation rénale et elle se caractérise par une interruption du flux sanguin au niveau de l'organe puis une reperfusion. Ce phénomène a un effet négatif sur la qualité et la vitesse de récupération fonctionnelle du rein après la greffe. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie pharmacologique efficace pour prévenir ou traiter la perte de fonction et les dommages rénaux induit par l'IR.

Dans ce projet nous utiliserons 1500 rats mâles sur 5 ans afin de mimer l'IR au cours de la transplantation rénale. Le modèle utilisé sera une ischémie reperfusion unilatérale suivi par une néphrectomie chez le rat. Cette étude permettra d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la récupération fonctionnelle et sur les dommages rénaux sévères post-ischémiques en clinique. Actuellement, aucun modèle in vitro ne peut mimer la transplantation rénale dans son ensemble et dans sa complexité. De ce fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des tunnels et des bâtons à ronger. Les animaux seront opérés sous anesthésie générale et un traitement antidouleur sera administré pendant 4 jours après la chirurgie. Une administration de solution physiologique en post-opératoire permettra de compenser la perte de fluides pendant la chirurgie. Compte tenu de la sévérité attendue de ces dommages rénaux, les animaux seront contrôlés deux fois par jour pendant dix jours après la

chirurgie (sauf le weekend – contrôle une fois par jour). En particulier, tout signe de souffrance, de modification de la motricité, du comportement, de la capacité à s'alimenter et s'hydrater normalement, l'apparition de signes tels que perte importante de poids, apparition de tremblements, poils hérissés, écoulement de larmes rouges, difficultés respiratoires et toute autre observation concernant l'état général de l'animal et le taux de mortalité seront documentés. Si l'état de l'animal le justifie et qu'aucune solution n'est applicable, il sera mis à mort. En accord avec la règle de raffinement, des prélèvements de sang et d'urine à différents temps par hébergement en cage métabolique permettront de mesurer des biomarqueurs d'intérêts pour évaluer l'effet des candidats médicaments sur cette pathologie et/ou d'en identifier de nouveaux pouvant prédire son évolution. L'utilisation de cages à métabolisme représente une méthode non-invasive permettant de mesurer la fonction rénale sans recourir à la mise à mort à différents temps du protocole et de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisé.

Une évaluation rétrospective de ce projet sera nécessaire étant donné qu'une procédure, pour des raisons expérimentales et scientifiques, doit être classée en procédure sévère

**9005** Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les rhumatismes inflammatoires sont à la fois invalidantes et sources d'isolement social. Plusieurs immunothérapies, ciblant notamment certains acteurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines) sont actuellement utilisées avec succès. Malheureusement, un pourcentage non négligeable de malades n'est pas réceptif à ces biothérapies, tandis que d'autres deviennent progressivement non-répondeurs malgré une efficacité spectaculaire initiale. L'asthme et les allergies respiratoires sont également des problèmes de santé publique croissants dont la prise en charge se heurte à certaines résistances médicamenteuses primaires ou secondaires. Il est donc nécessaire d'explorer des alternatives innovantes ciblant les mécanismes cellulaires impliqués dans ces pathologies inflammatoires et/ou immunologiques.

Des études expérimentales suggèrent que certains médicaments activateurs du récepteur nucléaire PPAR gamma diminuent la sévérité des lésions dans des modèles animaux d'arthrite ou d'asthme. De plus, l'activité de ces récepteurs nucléaires est diminuée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Des travaux suggèrent également que ce récepteur nucléaire pourrait contrôler la réaction inflammatoire chronique en interagissant avec la réponse immunitaire via les lymphocytes. Ainsi, les maladies inflammatoires de l'intestin et les rhumatismes inflammatoires sont classiquement associés à une réponse immunitaire médiée par certains lymphocytes (Th17) alors que l'asthme est associé à une réponse immunitaire médiée par d'autres lymphocytes (Th2).

Les lymphocytes T, impliqués dans l'inflammation, jouent un rôle physiologique essentiel dans les réponses de l'organisme contre des agressions diverses comme la lutte contre certains agents pathogènes dans le tube digestif. Cependant, leur hyperactivité est associée à des manifestations inflammatoires dans les tissus concernés (intestin, articulations et poumons notamment). Le contrôle de la maturation des différents lymphocytes T est donc décisif pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'inflammation et entrevoir de nouvelles approches thérapeutiques selon la nature de la réponse immunologique. Il faut noter que la différenciation de certaines cellules immunitaires nécessite l'activité du facteur de transcription ROR gamma t, lui-même réprimé par le récepteur nucléaire PPAR gamma.

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'importance de PPAR gamma dans la différenciation des lymphocytes T en situation normale ou lors de l'inflammation. Elle sera conduite chez des souris sélectivement déficientes pour le récepteur nucléaire PPAR gamma dans les cellules exprimant le facteur de transcription ROR gamma t par comparaison à des souris témoins sauvages.

Dans un premier temps, les conséquences tissulaires de l'absence de PPAR gamma en situation physiologique (animaux transgéniques sains) seront évaluées, en cytométrie de flux.

Dans un second temps, les conséquences de l'absence de PPAR gamma seront estimées, chez ces mêmes souris, lors d'une inflammation (évolution, sévérité) :

- polyarthrite induite par le collagène de type II (un mois) : pas d'équivalence in vitro.
- colite induite par le Dextran Sodium Sulfate (10 jours) : pas d'équivalence in vitro.
- asthme induit par la papaïne (deux jours) : pas d'équivalence in vitro.

Un total de 200 animaux, tous génotypes et groupes confondus, sera nécessaire, d'après notre étude statistique, pour ce projet. Les paramètres cliniques (poids, score clinique) seront mesurés quotidiennement (milieu enrichi) afin d'évaluer la sévérité de la maladie et ses conséquences sur la qualité de vie murine. L'état général de l'animal (prostration, absence de toilettage, pelage hérissé) sera conjointement analysé pour évaluer la douleur et prendre les mesures adaptées. Les scores cliniques permettront également de définir les « points limites » pour chaque modèle :

1. Colite : poids des souris et analyse des selles ; le score maximal par animal est de 8, et les animaux trop sévèrement atteints (score clinique  $\geq$  à 6) seront mis à mort.

2. Arthrite : gonflement et rougeur des pattes ; le score maximal est de 16, les animaux atteignant un score de 12 seront mis à mort. Une perte de poids importante ( $\geq$  20% versus témoins appariés) sera considérée comme un second point limite.

3. Asthme à la papaïne : suivi de la fréquence respiratoire deux fois par jour avec mise à mort à 2 jours. Une détresse respiratoire sévère par toux ou éternuement ou écoulement nasal ou sang visible, sera considéré comme point limite.

La répartition des différents lymphocytes au sein de l'organisme (répartition des différents lymphocytes dans les ganglions abdominaux, thoraciques ou juxta-articulaires, la rate, le poumon, la membrane de l'intestin) sera étudiée par cytométrie en flux après mise à mort (fin des études = « endpoint ») tout comme la sévérité des lésions par histologie.

**9006** En dépit des efforts réalisés ces dernières années dans la validation de nouvelles thérapies pour le traitement du cancer, les échecs restent fréquents.

Parmi les stratégies anticancéreuses, les thérapies ciblées ont connu un grand succès dans de multiples indications. Cependant, la cellule tumorale acquiert une résistance à ces thérapies et la maladie progresse dans les 5-7 mois. La compréhension des mécanismes de résistance est donc d'un enjeu majeur. L'obtention de modèles *in vivo* est essentielle pour comprendre ces mécanismes et pour identifier de nouvelles stratégies capables de reverser ces résistances. Il existe aujourd'hui un consensus selon lequel l'amélioration des systèmes d'évaluation passent par la mise au point de modèles *in vivo* mieux caractérisés et plus proches des pathologies cancéreuses étudiées. Les greffes de tumeurs humaines xéno greffées sur souris, ou PDX (pour Patient Derived Tumour Xenografts), permettent de conserver les caractéristiques de celles-ci à la fois d'un point de vue histologique et moléculaire. Les résultats obtenus sur ces modèles montrent une réelle extrapolation en médecine humaine.

Un projet clinique de 5 ans a été mis en place sur l'étude des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées.

Ce projet est divisé en deux parties :

-Une composante clinique où à l'aide des technologies à haut débit seront étudiés les mécanismes de résistances d'un point de vue génétique.

-Une composante préclinique qui a pour but de développer des modèles de résistances acquises aux thérapies, pour une validation fonctionnelle et l'identification de nouvelles thérapies. Ainsi, 250 tumeurs de patients seront xéno greffées sur des souris immunodéprimées.

Dans le cadre d'une collaboration avec le centre qui a mis en place ce projet clinique, les modèles de PDX obtenus nous seront transférés afin que nous vérifions que ces modèles ont conservés la résistance aux traitements observée chez les patients. Une fois les modèles validés ils seront conservés dans une "biobanque" afin de pouvoir proposer aux entreprises du médicament, aux chercheurs et aux médecins, des modèles précliniques bien qualifiés et caractérisés. Ces modèles constitueront des outils très importants pour comprendre et lutter efficacement contre le cancer.

La génération de modèle de souris greffées avec des tumeurs humaines est un processus à plusieurs étapes, dont la primo implantation est la plus critique : à cette étape, le taux de prise est extrêmement variable en fonction du type de cancer greffé.

Notre estimations est de 40% pour la primo implantation de tumeurs obtenues après chirurgie, celle-ci est basé par le taux de prise moyen attendu par rapport à l'établissement de PDX tout organe confondu (données obtenues de la littérature et croisées avec les résultats obtenus en interne).

En implantant 250 tumeurs, l'objectif est d'obtenir 100 modèles.

La moitié des modèles sera développée par le centre responsable du projet et l'autre moitié sur notre plateforme expérimentale, soit 50 modèles à transférer à raison de 10 modèles par an pendant 5 ans. Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 662 souris immunodéprimées par an, soient 3310 souris pour le projet (seul ces animaux sont capables de tolérer la greffe de tissus humains).

Dans le respect de la règle des 3 R,

1) Ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer sur l'animal la complexité des tumeurs humaines, et bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de cellules/tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine.

2) Pour chaque modèle obtenu, des lignées cellulaires seront dérivées. Des explorations fonctionnelles liées aux éventuels mécanismes de résistance et des tests pharmacologiques seront réalisés sur ces lignées. Les résultats ainsi obtenus permettront de sélectionner les drogues à tester in vivo et ainsi de Réduire le nombre d'animaux utilisés ultérieurement dans les évaluations précliniques de ces drogues.

3) Les animaux seront hébergés en petits effectifs par cage et manipulés dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les cages seront changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (Neslets). Les animaux seront anesthésiés lors de toute greffe. En cas de castration préalable à la greffe de cancer de la prostate, celle-ci sera réalisée sous anesthésie générale profonde et les animaux recevront un analgésique dans l'eau de boisson en pré et post opératoire. L'état physique et le comportement des animaux seront contrôlés quotidiennement. Toutes les méthodes susceptibles d'éviter ou de réduire les signes cliniques seront appliquées, permettant ainsi de Raffiner les études.

**9007** Sur le marché pharmaceutique actuel, aucune molécule n'est reconnue comme ayant un effet bénéfique sur la stéatohépatite (NASH) chez l'homme. Il devient fondamental de trouver de nouvelles molécules, du fait de l'augmentation significative de la prévalence de la NASH au niveau mondial. Des effets positifs furent constatés à partir d'une formulation composée de 5 plantes sur le métabolisme de souris HFD. Une purification de cet extrait a été réalisée (VAL63000NH).

L'objectif est de tester l'effet dose et l'efficacité de VAL63000NH sur le métabolisme de souris nourries avec un régime HFHCC (Régime riche en graisse, cholestérol et sodium cholate). Il s'agit d'un projet en phase préclinique à visée exploratoire, dans le cadre du développement d'une purification d'extraits de plantes, ciblant la NASH.

L'étude a été réalisée selon la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) est suivie :

\* 7 groupes de 14 souris C57BL/6J mâles âgées de 8 semaines en début de protocole, minimum pour obtenir un résultat statistiquement significatif. Les souris seront nourries avec un régime riche en graisse, en cholestérol et en sodium cholate (HFHCC) pendant 12 semaines. Les extraits de plantes et les contrôles positifs seront incorporés dans la nourriture des animaux. Ce nombre est une estimation basée sur nos précédents travaux et en tenant compte de la significativité des résultats.

\* Les procédures réalisées sur les animaux sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal :

- Suivi hebdomadaire de la pesée des animaux entre S0 et S12.

- Mesure de la composition corporelle en S0 et S12.

- Suivi toutes les deux semaines de la glycémie et insulïnémie, ainsi que les taux de triglycérides (TG) et cholestérol total circulants à jeun en S0, S2, S4, S6, S8, S10 et S12.

- Détermination d'une insulino-résistance hépatique en S8 et d'une sensibilité à l'insuline en S12.

\* Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme d'une NAFLD/NASH, en présence d'une insulino-résistance hépatique sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement in vivo.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 98 souris mâles C57BL/6J seront utilisées sur une durée de 12 semaines pour cette étude.

**9008** La démence représente l'un des troubles les plus importants, au sein de nos populations vieillissantes. Dans les populations européennes, la démence vasculaire représenterait la seconde cause de démence, après la démence dégénérative de type Alzheimer. La perfusion du cerveau (apport du sang) est régulée par la barrière hémato-encéphalique (BHE) protège le cerveau du reste de l'organisme. Elle contrôle les échanges entre le sang et le compartiment central et permet les apports d'oxygène et de nutriments nécessaires à la survie des cellules neuronales. La BHE est associée aux 650 km de capillaires cérébraux permettant au cerveau d'utiliser plus de 20% du sang mis en circulation par le cœur. Cette barrière est donc un élément essentiel pour le bon fonctionnement physiologique du cerveau. Elle agit comme une barrière étanche grâce à des structures cellulaires très jointives, que l'on pourrait comparer au zip d'une fermeture éclair. Il a été montré que cette étanchéité est dégradée chez des patients atteints de maladies neuro dégénératives, ce qui entraînerait la mort des cellules neuronales. Des observations post mortem ont montré que les cerveaux de personnes atteintes de la maladie neurodégénératives présentaient une BHE n'assurant plus sa fonction de filtre ; elle serait plus perméable. Grâce à l'imagerie cérébrale dynamique (IRM dynamique) — qui permet de voir la perfusion d'un liquide de contraste dans le cerveau —, les études ont montré que l'altération de la BHE débute dans une seule et même région précise du cerveau, l'hippocampe, impliquée dans la mémorisation. Il serait possible que ce changement de perméabilité à un stade précoce de la maladie précède l'atrophie de l'hippocampe observée à un stade plus avancé.

Le dysfonctionnement de la BHE est naturellement observé lors du vieillissement. Il faudrait trouver un moyen de prévention pour préserver les fonctions de cette barrière. Dans le groupe nous avons identifié un gène qui était capable de réguler l'ouverture de la BHE. Notre projet : nous voulons analyser si la prévention du dysfonctionnement de la BHE permet de protéger contre le développement des atteintes neuronales dans un modèle murin. Pour répondre à cette problématique, nous développerons un modèle de souris avec une hypoperfusion graduelle du cerveau. Ce modèle repose sur l'utilisation de bague (constricteurs) qui sont placés sur les carotides; ces constricteurs réduisent de façon mécanique graduellement le diamètre des artères et créent une ischémie cérébrale progressive chez des souris. Ce modèle a été validé comme un modèle pertinent pour le développement de pathologie neuronale chez le rongeur. Nous analyserons chez des souris génétiquement modifiées pour nos gènes candidats l'apparition des marqueurs de dégénérescences neuronales.

Le développement de modèles expérimentaux d'insuffisance vasculaire cérébrale ischémique répond à un véritable besoin pour améliorer nos connaissances physiopathologiques, pour conceptualiser et évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques qu'elles soient médicales et ou chirurgicales. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 268 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous nous efforcerons de réduire le nombre d'animaux dans nos expériences. Le nombre d'animaux a été calculé par rapport aux questions posées et au nombre optimal pour valider statistiquement les résultats quantitatifs. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Notre projet prend en compte le respect des animaux et la participation aux conditions d'enrichissement dans les cages.

**9009** L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 300 millions de personnes sont obèses et ce nombre ne cesse de s'accroître. Ces patients ont un risque accru de développer des pathologies chroniques telles que le diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires et plusieurs types de cancers. Soigner l'obésité permettrait ainsi de réduire de manière significative l'incidence de toutes ces maladies associées. Malheureusement, les traitements existants à l'heure actuelle sont peu efficaces et les régimes hypocaloriques ne conduisent qu'à une perte de poids temporaire, suivie très fréquemment par un retour rapide au poids initial dès la fin du régime (phénomène dit de « yo-yo »). Seule une intervention chirurgicale associant une réduction de la taille de l'estomac et une déviation de l'intestin est à ce jour efficace à long terme pour traiter l'obésité. Cependant, les risques et effets secondaires liés à cette chirurgie en font un choix de dernier recours réservé aux cas d'obésité les plus graves. Nous manquons ainsi d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires.

Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel. Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids. Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus.

Notre projet vise à étudier le rôle d'une protéine au sein de certains neurones de l'hypothalamus, connus notamment pour leur rôle dans l'adaptation du corps à un régime hypercalorique. Cette protéine permet en temps normal de détecter les niveaux d'énergie et de nutriments au sein des neurones. Pour ce faire, nous étudierons un modèle de souris génétiquement modifiées où cette protéine est absente de nos neurones d'intérêt. Ces souris seront comparées à d'autres souris de la même fratrie chez qui la protéine est toujours présente. Les conséquences de l'absence de cette protéine sur la régulation de la balance énergétique seront révélées au travers de diverses procédures expérimentales, allant de l'exposition à un régime riche en calories à l'injection de molécules qui influencent l'appétit. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation du poids corporel et seront cruciales pour déterminer si cette protéine représente une cible thérapeutique intéressante pour le développement d'un nouveau médicament.

Nous utiliserons au total un maximum de 904 souris adultes (âgées d'au moins 8 semaines) sur 5 ans. En effet, la souris représente un modèle de choix pour notre projet de par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. En respect du principe de 3Rs, nous avons néanmoins optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre tient aussi compte du fait que les expériences seront réalisées deux fois de manière indépendante afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Le suivi précis du poids et de la prise alimentaire de chaque souris nécessite un isolement de l'animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

**9010** Actuellement, les biotechnologies de la reproduction et de l'embryon sont largement utilisées par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le progrès génétique par la réduction de l'intervalle entre générations et l'augmentation de l'intensité de sélection. En fonction de la nature des embryons à transférer, les taux de gestation obtenus après transfert dans des femelles receveuses varient de 35 à 65%, entraînant d'importantes pertes économiques et de progrès génétique. Afin d'améliorer ces taux de gestation, de multiples programmes de recherche s'intéressent à l'amélioration de la qualité des embryons produits mais n'abordent que très rarement l'évaluation de la réceptivité de la femelle receveuse. Pourtant, il a été démontré que la gestation résulte d'interactions étroites et réciproques entre l'embryon et l'utérus justifiant pleinement l'étude de l'environnement utérin autour de la période d'implantation.

Face à ce constat, le projet présenté dans ce document vise à (1) collecter et étudier la composition du fluide utérin à différents moments du cycle œstral ainsi que l'évaluation de sa variabilité entre

cycles ; (2) à identifier des biomarqueurs présents dans le fluide utérin et/ou dans les cellules sanguines qui soient prédictifs de la qualité de l'environnement maternel et de la réussite au transfert d'embryon de bonne qualité. Pour cela, des prélèvements de fluide utérin et des prélèvements sanguins seront effectués à différents moments (plusieurs points par cycle œstral, sur plusieurs cycles œstraux) sur 28 génisses pubères de race Prim'Holstein ayant une réceptivité utérine contrastée. En effet, parmi les 28 génisses utilisées, 8 seront considérées comme des receveuses à "faible réceptivité utérine" (génisses recrutées vides après 2 ou 3 transferts d'embryons infructueux) et 20 comme « naïves » (génisses recrutées sans historique de reproduction). Suite aux prélèvements précédemment évoqués, le transfert d'un embryon de bonne qualité sera effectué sur chacune de ces génisses de façon à identifier deux groupes de femelles extrêmes : génisses « faible réceptivité utérine » vides au transfert et génisses « naïves » gestantes au transfert. Pour les génisses vides au 1er transfert d'embryon, un 2nd transfert sera réalisé. Les embryons transférés auront été préalablement produits in vitro à partir d'ovocytes collectés sur 4 femelles donneuses par ponction ovarienne écho-guidée. Les résultats des analyses qui seront effectuées sur le fluide utérin et le sang permettront d'évaluer les variations de ces milieux au cours des cycles œstraux mais également d'identifier des marqueurs candidats prédictifs de la réussite au transfert. Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : aucun modèle ex vivo ne permet à ce jour d'étudier la réceptivité utérine chez les bovins, justifiant ainsi le recours à l'animal.

Réduction : Au total, 32 femelles seront utilisées dans ce projet (4 génisses donneuses d'ovocytes + 28 génisses receveuses pour la collecte de fluide utérin et de sang). Compte-tenu du caractère exploratoire de l'essai, il est impossible d'apporter une justification statistique aux effectifs utilisés. Ces effectifs ont été établis pour permettre d'identifier au minimum 2x5 génisses extrêmes, effectif minimal pour identifier des marqueurs candidats dans les milieux analysés.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales.). De plus, les procédures utilisées dans le cadre de ce projet sont semblables aux techniques utilisées en élevage dans le cadre des activités de transfert embryonnaire et ne sont pas susceptibles d'engendrer de stress ou de douleur. Néanmoins, une anesthésie épidurale sera réalisée préalablement aux procédures expérimentales suivantes : collecte d'ovocytes, transfert d'embryons et prélèvements de fluide utérin.

**9011** Malgré les progrès thérapeutiques, les maladies cardiovasculaires (CV) ou cardio-neurovasculaires restent la première cause de mortalité dans le monde, la deuxième en France juste après les cancers. Les maladies cardiovasculaires ont principalement pour origine l'atteinte ischémique (manque d'oxygène) du myocarde et l'hypertension artérielle. L'évolution au long court est le développement de l'insuffisance cardiaque, le cœur n'est alors plus capable d'assurer la perfusion des tissus et le taux de mortalité atteint 50% à 4 ans. La recherche dans ce domaine reste donc un enjeu majeur de santé publique.

De plus, environ 3% des médicaments approuvés au cours des 20 dernières années ont, par la suite, été retirés du marché suite à l'identification d'effets adverses. Les effets indésirables cardiovasculaires représentent la plus fréquente cause d'arrêt de développement ou de retrait de médicament (27%). Ces effets délétères ont notamment été observés lors des traitements par chimiothérapie des cancers. En clinique humaine, les anthracyclines sont des agents antitumoraux très largement utilisés malheureusement ils induisent un certain nombre d'effets indésirables. La cardiotoxicité consiste essentiellement en des troubles du rythme et une insuffisance cardiaque aigue.

Les différentes étiologies humaines des maladies ou complications cardiovasculaires peuvent être reproduites chez l'animal par des interventions chirurgicales. En effet, les rongeurs (rats et souris) développent des atteintes CV de façon reproductible et répétable et sont donc des modèles de choix pour étudier le mécanisme d'action des nouveaux médicaments. Par ailleurs, l'insuffisance cardiaque ainsi que les cardiomyopathies suite aux chimiothérapies sont l'aboutissement d'un processus de

remodelage cardiaque sur le long terme, mettant en œuvre de multiples systèmes (immunitaires, neuronaux, endocriniens, rénaux.) dont les actions et leurs composantes ne peuvent être étudiées que chez l'animal. Ceci est un gage d'une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin en nouveaux traitements est urgent.

Par ailleurs toutes nos études respectent le principe des 3R :

**Réduire** : Le projet a été organisé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux tout en prenant en compte la mortalité post-chirurgicale qui de 30 à 50% et la variabilité interindividuelle à développer une dysfonction. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Compte tenu de ces critères, on estime devoir inclure un maximum de 6250 animaux sur les 5 ans tous modèles confondus.

**Remplacement** : Les processus impliqués dans l'insuffisance cardiaque sont trop complexes pour être étudiés sur cellules isolées. Par ailleurs ces études ayant pour but de valider l'efficacité de nouveaux médicaments une bonne prédictibilité est indispensable et seules l'utilisation des animaux permet de réaliser ces tests dans un système intégré et donc de présenter cette qualité.

**Raffinement** : Tous nos animaux sont hébergés dans des cages dont les dimensions sont en accord avec la législation européenne, en nombre adapté à l'espèce et aux dimensions de la cage et avec un enrichissement correspondant aux standards réglementaires dont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Pendant toute la durée de nos études, les animaux sont suivis quotidiennement, pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier une potentielle souffrance. Si les animaux présentent des signes de souffrances (tels que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, ...) des mesures sont mises en place pour y remédier et si ces signes devaient s'aggraver les animaux concernés seront sacrifiés. L'utilisation de l'échographie pour le suivi de la fonction cardiaque de manière répétée permet en outre d'éviter toute souffrance puis que c'est une technique d'imagerie exploration non invasive et se fait sous anesthésie. Pour les procédures qui peuvent induire de la douleur chez l'animal une analgésie per et post-opératoire est mise en place pour la réduire et la contrôler.

**9012** Les enzymes qui modifient la structure de la chromatine jouent un rôle important pour la régulation transcriptionnelle au cours du développement et à l'âge adulte. Les enzymes de la machinerie polycomb sont cruciales pour le maintien de l'état silencieux de nombreux gènes. Par exemple, cette machinerie est importante pour éviter l'expression de gènes neuronaux spécifiques dans une cellule du muscle. Elle a de multiples cibles et affecte donc différents processus biologiques tels que la différenciation, la prolifération ou encore le maintien des cellules souches. Un fonctionnement anormal de la machinerie Polycomb est un phénomène fréquent dans certaines pathologies comme les cancers. Il est donc important de comprendre comment ces protéines sont régulées. Les études au laboratoire se focalisent sur un complexe qui fait partie du groupe Polycomb. Pour comprendre sa régulation, nous avons purifié l'ensemble des protéines interagissant avec ce complexe dans les gonades. Cette expérience nous a permis de découvrir un nouveau partenaire. Cette protéine ne présente aucun domaine conservé qui pourrait nous révéler sa fonction et est conservée seulement chez les mammifères placentaires.

Après avoir caractérisé les mécanismes d'action précis de cette protéine in vitro, nous souhaitons déterminer le rôle de cette nouvelle protéine in vivo. Comme cette protéine est exprimée principalement dans les gamètes, nous nous intéressons particulièrement à son rôle dans la gamétogénèse. Notre modèle d'étude in vivo est la souris car la protéine que nous étudions est spécifique des mammifères.

Les modifications génétiques lors de la création de la nouvelle lignée transgénique nécessaire concernent uniquement la séquence codante pour la protéine. L'expression de la protéine étant restreinte aux gonades, nous ne nous attendons pas à ce que les souris transgéniques présentent un phénotype sévère.

Nous avons estimé à 120 le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour ce projet. Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux et exploiter au mieux les prélèvements, des informations seront obtenues au niveau phénotypique, cellulaire et moléculaire à partir du même animal.



La stratégie de croisement des souris transgéniques est optimisée afin d'obtenir les cohortes de souris appropriées.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R :

Remplacement : La sélection des expériences pertinentes s'appuie sur de nombreuses expériences préalables effectuées in vitro sur des lignées cellulaires. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre le rôle dans la gamétogénèse, un processus qui ne peut pas être modélisé in vitro. Par ailleurs, cette protéine n'existant que chez les mammifères placentaires, nous ne pouvons pas utiliser d'organisme modèle inférieur.

Réduction : Notre travail in vitro permet de réduire autant que possible le nombre d'animaux. Nous pratiquerons quand c'est possible, plusieurs types d'analyses cellulaires et moléculaires à partir des prélèvements du même animal.

Raffinement : par une manipulation minimale des animaux vivants. En cas d'apparition de signes de souffrance ou de détresse des animaux mutants, une procédure d'euthanasie sera immédiatement mise en place.

**9013** Nos sociétés abondantes en aliments très palatables car riches en sucre et en graisse favorisent la prévalence de mauvaises habitudes alimentaires dès l'enfance ou l'adolescence. Ces comportements précoces peuvent affecter durablement les choix alimentaires adultes. Il a été montré que l'adolescence est une fenêtre critique de vulnérabilité au cours du développement cérébral, caractérisée par des comportements spécifiques et une sensibilité accrue aux récompenses.

Nos données récemment acquises sur le rongeur indiquent qu'une surconsommation de sucre pendant l'adolescence altère durablement la sensibilité et la motivation à consommer des aliments palatables à l'âge adulte et fait émerger un profil comportemental spécifique rappelant la dépression. De même une expérience précoce avec des aliments hautement palatables altère la maturation des circuits cérébraux du plaisir alimentaire encore en cours de développement et modifie durablement l'impact hédonique des aliments.

Nous avons pu mettre en évidence l'impact d'une alimentation hautement palatable à l'adolescence sur le comportement alimentaire à l'âge adulte et par quels processus neurobiologiques cette expérience affecte la perception sensorielle plaisante ou non des aliments. Une modification du plaisir alimentaire et de la sensibilité des systèmes de récompense pourrait ainsi être l'un des déterminants clés des dérèglements du comportement alimentaire.

L'ensemble de ces expériences nous a permis de montrer que la surconsommation de sucre pendant la période d'adolescence du rat entraîne à l'âge adulte un phénotype comportemental dépressif qui est reversé par un antidépresseur. Ces données ont été soumises dans un journal scientifique pour publication. L'éditeur souhaite des expériences contrôles, réalisées chez des rats adultes, avant publication. C'est pour cette raison que notre projet porte aujourd'hui sur les effets d'une surconsommation de sucrose à l'âge adulte sur le phénotype dépressif. Ne pouvant remplacer cette étude par un autre modèle, nous faisons tout de même en sorte de travailler en accord avec la règle des 3R. Pour cela nous avons réduit au maximum notre effectif d'animaux. Afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques correctes, nos expériences comportementales porteront donc sur un effectif de 16 rats. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées et disposent d'un milieu enrichi. Ils sont manipulés régulièrement afin d'inhiber tout stress et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas d'apparition de signes de souffrance.

**9014** A la suite d'une blessure cutanée (coupure ou brûlure), le processus de cicatrisation commence ; il se déroule en trois étapes :

- Une phase vasculaire et inflammatoire,
- Une phase de réparation
- Une phase de maturation (remodelage)

Certaines blessures guérissent facilement alors que d'autres vont prendre plus de temps, surtout si elles sont graves ou si la personne présente un état physiologique fragilisé ou pathologique, comme le diabète.

Les personnes diabétiques peuvent alors être sujettes aux plaies chroniques ; une plaie chronique étant une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé, 4 à 6 semaines d'évolution, selon son étiologie.

Le projet est d'étudier la cicatrisation de différents types de plaies cutanées. Les plaies seront induites par une pression forte (modèle escarre), une excision (coupure) ou une brûlure en fonction de l'état pathologique des souris (saines versus diabétiques).

Dans un premier temps, le but sera d'évaluer le délai de cicatrisation de chacune de ces plaies chez des souris immuno déficientes. Dans un second temps, le but sera d'étudier l'effet bénéfique de différents traitements cellulaires sur la cicatrisation de ces plaies par injections au niveau de la plaie de diverses cellules ou mix de cellules.

La cicatrisation repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ces souris immuno déficientes n'ont aucun phénotype particulier ; elles seront élevées dans des cages à couvercle filtrant.

Lors des inductions de plaie, les souris seront anesthésiées à l'isoflurane ou par un mélange xylazine/kétamine (selon le type de plaie). A la suite de plaies sévères, les souris bénéficieront d'un traitement antalgique sur plusieurs jours.

Pour le suivi de la cicatrisation nécessitant une immobilisation des souris et afin de limiter leur stress, celles-ci seront maintenues sous une légère anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué au minimum 3 fois par semaine. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal.

En cas d'atteinte d'un point limite en cours d'expérimentation, la souris sera mise à mort.

Ce projet concernera 648 souris au maximum.

**9015** Du fait du fort nombre de cas de cancers et d'une mortalité associée encore élevée, l'oncologie représente un enjeu scientifique et clinique très important. Dans le but d'identifier de nouveaux candidats médicaments, les chercheurs développent de nouveaux outils in vitro permettant de sélectionner et d'optimiser des composés. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs sous-cutanées chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Nous développons de nouvelles approches thérapeutiques en oncologie ayant pour but de restaurer l'activité du système immunitaire et permettant ainsi un arrêt de la progression tumorale / l'élimination de la tumeur. Ces approches sont basées sur l'utilisation d'anticorps innovants ciblant une molécule impliquée dans l'échappement immunitaire tumoral. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans une activité de recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques (déjà utilisés en clinique ou en cours de développement), avec un nombre de 20 études par an, comprenant 120 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 12000 souris).

Nous proposons donc d'évaluer, les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins bien décrits dans la littérature. Ces modèles sont basés sur l'implantation de cellules tumorales sur des souris de même fonds génétiques que les lignées cellulaires. Dans le cas particulier d'étude sur des lignées de cellules tumorales humaines, nous proposons aussi des modèles sur des souris immunodéficientes. Les tumeurs sont des ensembles cellulaires complexes avec un fonctionnement de type « organe », c'est pourquoi l'utilisation de modèles animaux est justifiée et ne peut être substituée par de l'expérimentation in vitro.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions en respectant les règles de bioéthiques (grâce à l'utilisation d'analgésie, au recours à l'anesthésie) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés in vitro, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre

d'animaux. Les groupes sont de 20 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de répéter une étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

**9016** Ce projet concerne l'étude chez le rongeur (rat) des modifications cérébrales et comportementales suite à une exposition à l'alcool. Nous avons choisi le rongeur adolescent car de nombreuses données chez l'homme et l'animal montrent que cette période d'adolescence est particulièrement vulnérable aux effets délétères de l'alcoolisation. Nous exposerons donc des rats adolescents (pendant leurs périodes post natales de Jours 30 à Jours 46 à soit de l'eau soit de l'alcool (10%). Différentes voies d'administration d'alcool seront utilisées (injection et ingestion). Avant la période d'alcoolisation et à différents temps après cette période d'alcoolisation, les animaux seront testés comportementalement dans un test de prise de décision (Rat Gambling Task) très similaire dans ses caractéristiques à celui utilisé chez l'homme (Iowa Gambling Task) et en imagerie cérébrale (IRM) afin d'essayer de corrélérer des modifications d'activité cérébrales avec des modifications comportementales.

Nous nous efforçons d'appliquer de bonnes pratiques d'expérimentation animale en accord avec la règle des 3R. Les effets comportementaux ne pouvant être étudiés chez un modèle *in vitro*, le modèle animal ne peut pas être ici remplacé. Cependant le nombre d'animaux utilisé est limité au strict nécessaire afin de garantir la significativité de nos résultats. En effet, l'un des grands avantages de l'imagerie cérébrale est son aspect longitudinal qui permet plusieurs mesures chez le même animal, réduisant ainsi les effectifs. Les animaux sont hébergés dans des animaleries thermorégulées dans un milieu enrichi, et sont observés quotidiennement afin de réagir au plus vite en cas de signes de souffrance. La mise en place de points limites adaptés à nos protocoles expérimentaux nous permet ainsi de veiller au bien-être des animaux et de leur apporter les soins adéquats (analgésie, réhydratation, désinfection) lorsque cela s'avère nécessaire. Ce projet portera sur un effectif global de 44 rats.

**9017** Depuis l'émergence de la toxoplasmose cérébrale chez les Sidéens et les individus immunodéprimés lors de greffes d'organes, il est apparu indispensable de rechercher les composants moléculaires intervenant dans le contrôle de l'infection chronique. En particulier, nos études visent à élucider les mécanismes parasitaires assurant l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes, l'enkystement du parasite sous sa forme latente dans le cerveau et la réactivation de l'infection. Pour cela, les objectifs principaux de nos travaux sont donc d'élucider d'une part, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des gènes de virulence et la biogenèse des organites apicaux sécrétoires qui jouent un rôle déterminant dans la survie et la dissémination parasitaire, ainsi que la modulation des réponses immunes de l'hôte infecté. D'autre part, nous étudions les mécanismes régulant la différenciation de la forme virulente répliquative, le tachyzoïte, vers la forme latente chronique, le bradyzoïte, afin d'éliminer par chimiothérapie les kystes toxoplasmiques résidents dans le cerveau des individus infectés.

La caractérisation fonctionnelle de nouveaux facteurs de virulence parasitaires se fait par des études principalement menées sur des lignées cellulaires primaires ou transformées cultivées *in vitro*. Cependant, l'importance de ces facteurs dans le pouvoir de dissémination du parasite et l'établissement de la forme chronique latente dans les muscles et le cerveau ne peut s'examiner que par l'utilisation d'un modèle d'infection de la souris, qui représente un hôte naturel du parasite. Ainsi, l'utilisation de la souris comme modèle d'infection nous permet de valider des cibles potentielles pour le développement de drogues antiparasitaires. De plus, il n'existe aucune technique *in vitro* permettant de générer des kystes matures de *T. gondii*, il est donc nécessaire de produire ces derniers dans le cerveau des souris. Finalement, la physiopathologie et le tropisme des différentes souches de *T. gondii* pour les différents organes ne peuvent s'examiner que chez la souris. Par ailleurs, les anticorps dirigés contre des protéines parasitaires ne sont pas disponibles dans le commerce et doivent être générés au sein du laboratoire pour des études *in vitro*. Le rat est le modèle

idéal pour la production d'anticorps ciblant ces protéines parasitaires. Pour l'obtention des anticorps, deux semaines après la dernière injection des protéines recombinantes, l'animal est anesthésié par une injection intrapéritonéale de kétamine/xylazine, le sang est alors récupéré par ponction intracardiaque et les animaux sont ensuite immédiatement euthanasiés.

Le recours à l'utilisation d'animaux est substitué ou minimisé autant que possible mais garantissant la significativité statistique. De plus, nous utilisons des anesthésiques permettant de limiter la souffrance et le stress des animaux. Les points limites que sont les signes traduisant une souffrance significative (hypoactivité, prostration) entraîneront une euthanasie immédiate de l'animal après anesthésie à l'isoflurane 2%. D'autres signes précédant cet état nous permettent de prédire précocement l'euthanasie de l'animal (diminution de l'exploration, poil hérissé). Notre projet inclura 25 rats et 100 souris qui seront utilisés pour la production d'anticorps polyclonaux ; 3120 souris seront nécessaires pour l'étude des fonctions biologiques de facteurs parasitaires potentiellement impliqués dans la virulence du parasite et l'établissement de la forme chronique de l'infection. 144 souris seront utilisées afin de réaliser de l'imagerie par bioluminescence mesurant le pouvoir invasif du parasite dans les organes. L'étude des fonctions biologiques de facteurs parasitaires impliqués dans la différenciation kystique dans le cerveau nécessitera environ 2520 souris.

**9018** Les pullulations importantes et l'expansion des aires de colonisation du rongeur fouisseur nuisible *Arvicola terrestris scherman* (ATS ou campagnol terrestre) dans les écosystèmes agronomiques et touristiques de moyenne montagne, sont des problèmes de plus en plus cruciaux en Auvergne, comme en Franche Comté et dans d'autres pays voisins en Europe. Les incidences économique, écologique et environnementale sont très importantes et la situation préoccupante. Malgré une surveillance accrue et une lutte chimique raisonnée, mais non conforme aux exigences de la réglementation européenne, le constat est fait qu'il est nécessaire de mieux articuler les stratégies de lutte et de développer de nouveaux outils. Le projet proposé consiste en la mise au point d'un vaccin contraceptif efficace pour juguler les pullulations cycliques du rongeur fouisseur nuisible *Arvicola terrestris scherman*. La stratégie expérimentale choisie consiste en la définition d'un ensemble d'antigènes spermatiques immunogéniques chez le campagnol conduisant à une réduction de la fertilité par interférence avec les processus moléculaires de reconnaissance des gamètes (fécondation). L'enjeu réside dans l'obtention d'un maximum de spécificité d'espèce associé à une grande efficacité compte tenu du fait que les voies d'immunisations possibles ne sont pas les plus favorables à la réponse immune chez les mammifères. Si un tel vaccin contraceptif peut être développé, il sera une alternative à la lutte chimique utilisée à ce jour.

L'utilisation des animaux est indispensable à ce projet et les effectifs seront gérés de manière à répondre successivement aux questions biologiques posées. Nous estimons qu'un maximum d'une centaine d'individus par an sera nécessaire à la réalisation du projet (donc au maximum 500 individus sur la période de 5 ans). Les animaux seront hébergés dans des conditions les plus proches possibles de leur environnement (dans des enceintes à l'abri de la lumière naturelle, avec une température régulée) et avec des enrichissements de leur milieu leur permettant de reproduire le comportement de "terrier" (utilisation d'igloos en matière végétale condensée comestible). Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane) et les sites d'injections seront spécifiquement surveillés pour éviter l'apparition de nécroses. Des animaux manifestant des signes évidents de douleur seront immédiatement retirés de la procédure en cours et euthanasiés par inhalation de CO<sub>2</sub>.

**9019** Notre objectif général est d'évaluer la capacité d'adaptation des espèces aux changements climatiques et de comprendre comment ces changements peuvent se répercuter sur la compétition entre espèces, leur coexistence et leur distribution.

Pour ce faire nous suivons des populations naturelles de plusieurs espèces de rongeurs africains (gerbilles, rats à mamelles, rat des rochers, la souris naine, rats à poches), mais nous nous concentrons tout particulièrement sur la souris striée africaine, ceci dans leur milieu naturel en Afrique du Sud.

Nous sommes soucieux du bien être des animaux que nous manipulons et appliquons dans la mesure du possible la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) sachant que le 3ème R n'est pas compatible avec l'objectif de notre étude.

Nous réalisons des piégeages avec des pièges contenant du coton et de la nourriture et placés à l'abri du soleil (Raffiner).

Lorsqu'un animal est piégé, nous le marquons avec une paire de boucles d'oreilles numérotées et un micro-transpondeurs sous-cutané (permettant d'identifier les individus et de réduire le temps de manipulation lors de la recapture), nous prélevons environ 1cm de queue pour des analyses génétiques et quelques poils pour l'étude du régime alimentaire.

Les animaux sont maintenus au calme avec de la nourriture après leur manipulation puis relâchés sur le lieu précis de leur capture (Raffiner). Nous sommes particulièrement vigilants avec les femelles gestantes et allaitantes bénéficiant d'un surplus de nourriture avant d'être libérées au plus vite. Une partie importante des animaux libérés retournent dans le piège lors d'une même session de piégeage et/ou quelques mois plus tard, ce qui suggère un impact relativement faible de notre manipulation sur la survie des animaux.

Lorsqu'une souris est re-capturée lors d'une même session son identité et état reproducteur sont notés et la souris est immédiatement libérée au point de piégeage sans plus de manipulation. Une analyse statistique de la variation des taux de recapture au cours du temps nous permet d'estimer les tailles des populations et la survie des individus (Réduire). La durée d'une session de capture varie de 3 à 6 jours et dépend des taux de recapture intra-session : les piégeages s'arrêtent lorsque l'on a dépassé un taux de recapture de 40% (c'est-à-dire 40 rongeurs déjà marqués pour cent rongeurs piégés ; un taux suffisant pour estimer statistiquement la taille de la population sans pour autant piéger tous les individus (Réduire)). Les tailles de populations peuvent varier de 1 à 200 individus suivant les saisons et les années.

Pour le moment nous suivons 2 populations sur 4 ans : durée minimale pour des études de dynamique de populations sur ce type d'animaux.

**9020** La maladie d'Alzheimer toucherait près de 50 millions de personnes dans le monde aujourd'hui et aucun traitement n'est disponible pour stopper ou ralentir l'évolution de cette maladie neurodégénérative. La maladie d'Alzheimer est définie par la présence de deux "anomalies" dans le cerveau des patients : des "plaques" de protéines amyloïdes et des "agrégats" de protéine Tau. Ces 20 dernières années, la recherche scientifique et médicale s'est focalisée sur les plaques amyloïdes mais des études récentes ont montré que les "anomalies" Tau étaient en fait celles qui corrélaient le mieux avec les troubles cognitifs des patients. Aussi, il est actuellement supposé que les "anomalies" Tau (très toxiques pour les neurones) pourraient se propager dans le cerveau des patients de neurones en neurones comme des prions (c'est-à-dire comme des protéines infectieuses) et tuer les cellules les unes après les autres, dans tout le cerveau. Ce modèle expliquerait la progression inéluctable de la maladie vers la démence une fois le processus neurodégénératif enclenché.

Les échecs récents des grands essais cliniques dans le domaine de la maladie d'Alzheimer sont en grande partie expliqués par la faiblesse de la recherche préclinique sur cette pathologie, qui repose sur une mauvaise modélisation animale de la maladie chez des souris transgéniques. La modélisation cellulaire in vitro, quant à elle, ne permet pas de recréer un réseau de neurones complexe pour étudier la dissémination longue distance de protéines pathologiques de neurone en neurone, impliquant potentiellement les cellules environnantes, appelées cellules gliales. De plus, ces modèles cellulaires, ni même les modèles de souris transgéniques ne permettent d'observer les conséquences fonctionnelles cognitives et comportementales de la dissémination de ces protéines, comme on le voit dans la maladie d'Alzheimer. Pour comprendre et combattre la maladie d'Alzheimer, il est aujourd'hui fondamental de développer une recherche préclinique étudiant un système nerveux proche de celui de l'Homme, dans sa biologie, son anatomie et sa "connectivité" et son comportement. Ainsi, dans ce projet, nous proposons donc de travailler chez le singe rhesus afin de mieux comprendre la maladie pour, à terme, développer de nouveaux traitements.

Nous proposons ici, afin d'étudier la dynamique de propagation des "anomalies" Tau dans le cerveau, d'injecter des protéines Tau anormales issues de cerveaux de patients directement dans des cerveaux de singes, dans différentes régions "clés" pour le développement de la maladie. Ensuite, les singes seront suivis pendant 2 ans afin de voir s'ils développent des troubles de la mémoire et afin de suivre l'évolution des "anomalies" Tau dans le cerveau grâce à des techniques non invasives et non douloureuses comme l'IRM et le TEP-scanner. Après 2 ans d'évolution, les singes seront

euthanasiés afin de récupérer leur cerveau et d'étudier leurs anomalies cellulaires et moléculaires. Au total, et selon les règles éthiques de réduction, 25 singes seront opérés et suivis dans cette étude (5 par groupe expérimental). Ceci est rendu possible grâce au suivi longitudinal des animaux en TEP et IRM, où chaque animal est son propre contrôle. Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, "jouet", fond sonore ...). Toute intervention nécessaire à l'expérimentation sur l'animal sera réalisée sous anesthésie locale ou générale et complétée par l'utilisation d'analgésiques afin d'assurer le meilleur confort qui soit. Les points limites seront respectés ce qui nous amènera à prendre les dispositions qui s'imposent de la façon la plus précoce et la plus adaptée possible. Pour cela, tous les animaux seront surveillés pluri quotidiennement par nos techniciens animaliers et par les chercheurs formés et habitués à interagir avec ces espèces animales. Cela permettra de discuter au cas par cas des soins à apporter à l'animal en fonction des besoins.

Cette étude permettra de valider expérimentalement la théorie "prion" de la maladie si on retrouve à distance du site d'injection des "anomalies" Tau. Elle permettra également de comprendre comment se propage le processus de mort neuronal et d'en étudier les causes. Ce travail permettra aussi de développer de nouvelles techniques d'imagerie (en IRM et en TEP) qui pourront ensuite être appliquées chez l'Homme. Enfin, ce projet permettra, s'il est concluant, d'établir un modèle animal préclinique très proche de la pathologie humaine, qui permettra de tester de nouvelles molécules thérapeutiques.

**9021** L'objectif du projet est d'étudier l'effet de composés (médicaments, substances chimiques ou produits biologiques) à visée thérapeutique contre la tuberculose, et d'évaluer la pathogénicité de différentes souches bactériennes de *Mycobacterium tuberculosis* sauvages ou mutantes, ainsi que la contribution de l'hôte à la pathogénicité des mycobactéries in vivo chez la souris.

A ce jour, aucun système in vitro ne permet d'englober tous les aspects de l'interaction hôte-pathogène qui aboutissent à la tuberculose pulmonaire évolutive. De plus, l'évaluation de la pathogénicité de ces mycobactéries peut aider à développer de nouvelles stratégies de vaccination contre la tuberculose, qui nécessite des modèles in vivo pertinents qu'il n'a pas été possible jusqu'ici de remplacer par des tests in vitro.

De nombreux aspects de la pathogénicité étant comparables entre l'homme et la souris, il est admis que la souris, classiquement Balb/C et C57BL/6, constitue un modèle incontournable pour le suivi de la réplication du bacille tuberculeux in vivo et l'étude de l'interaction entre l'hôte et les mycobactéries. Par ailleurs, les différentes stratégies innovantes de vaccination contre les mycobactéries pathogènes peuvent être évaluées et validées chez la souris qui peut être infectée efficacement par des souches de *M. tuberculosis* pathogènes humaines et développe une tuberculose pulmonaire active.

Seules les études in vivo permettent de déterminer l'efficacité de tels composés face à une épreuve virulente de *M. tuberculosis* et sont requises avant tout passage à l'homme, car en dépit du fait que les modèles rongeurs diffèrent de l'homme, la communauté internationale s'accorde à dire que l'efficacité chez la souris constitue un prérequis avant toute phase clinique.

Afin de permettre de générer des résultats statistiquement analysables et de montrer la reproductibilité des observations, les expériences (comptant environ une centaine de souris) seront répétées 3 fois avec un nombre de 4 animaux par groupe expérimental. Ainsi 6920 souris, toutes lignées confondues, seront utilisées pour ce projet.

Afin de réduire le nombre d'animaux, nous développons un système d'imagerie du petit animal au sein du Laboratoire de Haute Sécurité pour permettre une quantification de l'infection sans avoir besoin de sacrifier l'animal. Nous espérons à terme que cela puisse réduire le nombre d'expériences. De façon à réduire le stress, l'inconfort et la douleur, les souris ne seront pas soumises à des traitements ou des prélèvements répétitifs. De plus, la surveillance sera accrue (2 à 3 fois par semaine, voire quotidienne selon les procédures), afin de détecter l'éventuelle morbidité le plus tôt possible (changement de comportement, prostration, tremblement, aspect physique externe). Les souris seront sacrifiées au maximum 7 semaines post-infection, i.e., avant l'apparition des signes de morbidité, sur la base des connaissances de la souche *M. tuberculosis* H37Rv de type sauvage qui est la plus pathogène parmi les mycobactéries que nous étudions. Si des signes de morbidité étaient

observés, les points de cinétiques seront revus et réajustés, les individus seront euthanasiés et les analyses prévues réalisées plus précocement par rapport à celles initialement prévues.

**9022** Plusieurs études suggèrent qu'un stress périnatal augmente la susceptibilité d'apparition de pathologies mentales à l'âge adulte. Ces stress périnataux pourraient induire des modifications épigénétiques à l'origine de l'augmentation de cette susceptibilité. Ces modifications épigénétiques se répercuteraient au niveau architectural puis fonctionnel dans le cerveau et conduiraient à des comportements pathologiques.

L'amélioration du pronostic des pathologies mentales liées au stress repose donc sur la découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices. Les objectifs de ce projet visent donc (1) à déterminer si les facteurs de stress sont impliqués dans le dépôt de ces marques épigénétiques à l'origine de l'apparition des pathologies mentales ou des défauts cognitifs dans les populations stressées pendant la période périnatale (2) à évaluer l'efficacité de différentes stratégies neuroprotectrices contrecarrant ces modifications épigénétiques induites par le stress.

Dans le but de vérifier cette hypothèse nous induirons des stress répétés chez le souriceau (embryonnaire ou nouveau-né) afin de mimer des pathologies humaines, puis nous étudierons l'épigénome du cerveau de ces souris, soit peu de temps après le stress, soit plusieurs semaines après. Nous nous intéressons en particulier au rôle de deux types de stress : le stress alcoolique, qui mime les effets d'une intoxication alcoolique chronique chez la femme enceinte (syndrome d'alcoolisation fœtale, SAF) et le stress inflammatoire chez le souriceau, qui mime l'inflammation périnatale au cours du 3ème trimestre chez la femme enceinte. Nous nous intéressons plus particulièrement au rôle de deux facteurs de stress (HSF) en étudiant des animaux transgéniques dont les gènes codant pour ces facteurs sont inactivés.

Dans ces modèles, il sera étudié l'évolution des processus épigénétiques, les altérations du développement cérébral et les déficits cognitifs associés. Les expériences seront réalisées chez 2982 souris. La bonne reproductibilité et le très faible taux d'échec (5%) de ces modèles expérimentaux permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe. La règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement) a été respectée et des points limites ont été mis en place en plus de l'observation régulière du comportement des animaux afin d'identifier toute souffrance et douleur et en mettre fin.

Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée in vitro sur des cultures cellulaires. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce stress mettent en jeu l'interaction de plusieurs types cellulaires au cours du développement cérébral qu'il est impossible de reproduire in vitro et surtout repose sur l'étude des phénotypes comportementaux qui en découlent. Il est donc indispensable d'associer, aux études in vitro, des études chez l'animal entier soumis à des stress périnataux.

**9023** Les principes de la perception sensorielle demeurent aujourd'hui une importante question expérimentale et théorique. Une des difficultés majeures est que la perception émerge dans des systèmes d'aires sensorielles connectées les unes aux autres de manière complexe et dont l'activité est connue de manière très parcellaire par des enregistrements de petits nombres de neurones chez un animal. En conséquence les modèles actuels du traitement sensoriels sont incomplets et échouent à expliquer beaucoup de structures perceptuelles fondamentales établies sans effort par le cerveau comme les formes de bases constituant les objets (lignes, courbes, textures) et les signatures des sons communs (timbre d'un instrument de musique, signature du genre dans une voix, sons provenant d'un choc etc...).

Nous proposons, dans ce projet, d'établir une nouvelle approche d'étude des systèmes sensoriel qui combine de nouveaux outils mathématiques de traitement des données, inspirés du fonctionnement du cerveau, les réseaux profonds, avec des méthodes d'enregistrement optique à très haut-débit (>1000 neurones simultanément) permettant pour la première fois un échantillonnage extensif de zones cérébrales entières avec une résolution à l'échelle de la cellule.

Nous appliquerons cette approche au système auditif de la souris en premier lieu, puis nous l'étendrons à des structures associées du cerveau.

Cette approche d'exploration extensive d'un système entier du cerveau du mammifère est rendue possible par l'apparition de nouveaux outils de microscopie et de génétique disponible uniquement chez la souris, qui, dans le cas présent, ne peut être remplacée par aucun autre modèle.

Grâce à l'utilisation de ces méthodes, combinées à des algorithmes de traitements de grands ensembles de données nous obtiendrons une caractérisation extensive du système auditif et de ses interactions avec d'autres systèmes en utilisant un minimum d'animaux. Ainsi, pour cette expérience impliquant environ 6 chercheurs à plein temps et couvrant 12 structures cérébrales avec un total estimé de plusieurs millions de neurones enregistrés, seulement 1200 souris seront utilisées sur 5 ans, dont près de la moitié dans des tâches comportementales, en incluant les nécessaires procédures préliminaires de calibration de l'imagerie. Le nombre d'animaux utilisés est aussi minimisé par la possibilité de réutiliser de nombreuses fois le même animal (sur un temps long afin de limiter le stress induit) pour augmenter la taille de l'échantillon de neurones collecté. Afin de minimiser l'impact sur le bien-être animal, les souris impliquées dans les expériences seront progressivement habituées à l'appareillage expérimental de manière à atténuer le stress lié à la contention et l'état de santé des animaux sera suivi selon des indicateurs de poids, d'aspect général et de comportement associés à des points d'arrêts précis.

**9024** La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui touche principalement le jeune adulte avec une prédominance féminine. Le nombre de patients atteints de MC actuellement suivis en France est de l'ordre de 120000. L'incidence est de 4000 nouveaux cas par an en France. Cette maladie peut être particulièrement invalidante en touchant l'ensemble du tube digestif ainsi que des sites extra-digestifs et peut altérer de manière importante la qualité de vie des patients. Elle se manifeste par une diarrhée chronique, des douleurs abdominales, un amaigrissement involontaire, une dénutrition parfois sévère, une fièvre, des lésions ano-périnéales ou des manifestations extra-digestives. Les patients atteints de la MC peuvent présenter une malnutrition protéino-énergétique et des carences en vitamines et micronutriments. Ce déclin de l'état nutritionnel affecte notamment la masse et la force du muscle squelettique et favorise la fatigue musculaire locale. A ce titre, le muscle squelettique est un acteur à part entière de la chronicité de la MC et des complications post et péri-opératoires. Les conséquences invalidantes de la MC, sa nature chronique et récidivante, ainsi que l'absence de traitement curatif spécifique font de cette maladie un problème socio-économique majeur. L'ensemble de ces arguments est en faveur de la mise en place d'axes de recherche visant à définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles prises en charge préventives pour aider à contrôler les poussées et à prévenir les récives de la MC. Bien qu'imparfaitement connue, l'étiologie de la MC est vraisemblablement multifactorielle. Elle résulterait d'une réponse immunitaire aberrante en réponse à une stimulation par le microbiote intestinal chez des individus génétiquement prédisposés et/ou sous l'influence de facteurs environnementaux. Le microbiote intestinal constitue un écosystème complexe dont l'impact sur la santé de l'Homme est aujourd'hui largement reconnu. Ces dernières années, le rôle incontournable du microbiote dans le développement de la MC a été largement documenté. L'étude de la microflore intestinale des patients atteints de MICI a permis de mettre en évidence une dysbiose généralisée ou localisée, se traduisant par : i) une restriction des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes; ii) une diminution de la proportion de certains groupes bactériens tels que *Clostridium leptum* dont le principal représentant est *F. prausnitzii* et iii) une augmentation de la proportion de bactéries à Gram négatif, en particulier les Entérobactéries dont *Escherichia coli* adhérent invasif. Les modifications de l'écosystème sont autant de pistes pour tenter de restaurer une normobiose et font du microbiote une cible thérapeutique privilégiée dans le cadre de la MC. Dans ce contexte une piste thérapeutique séduisante est celle qui consiste à cibler le microbiote dysbiotique de la MC pour tenter d'impacter durablement l'évolution péjorative de la maladie. Ceci pourrait être envisagé par la mise en place d'une activité physique (AP) régulière ou par une complémentation nutritionnelle spécifique. L'effet bénéfique de l'AP sur la composition corporelle (diminution de masse grasse et augmentation de la masse maigre), l'aspect inflammatoire et métabolique n'est plus à démontrer. Plus récemment, il a été montré que l'AP pouvait impacter favorablement le microbiote intestinal. Le curcumin fait partie des polyphénols et est utilisé depuis l'antiquité pour ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et immunomodulatrices. En outre, de par ces effets, il favoriserait la diversité de l'écologie microbienne colique et améliorerait aussi la fonction de barrière intestinale. Parallèlement, en lien avec l'activité physique, le curcumin présente également l'avantage de stimuler la régénération musculaire et semble doté d'un potentiel anti-catabolique. L'association de ce composé avant et/ou après l'exercice semble également être



bénéfique sur la composition corporelle, et au niveau tissulaire sur un plan métabolique. Il améliore notamment l'effet de l'exercice sur la biogenèse mitochondriale du muscle squelettique en modèle murin. L'objectif du projet proposé est d'étudier l'impact d'une activité physique spontanée et d'un apport en curcumin sur l'évolution du microbiote intestinal, l'inflammation intestinale, et l'évolution de la composition corporelle (tissu adipeux et masse musculaire) à partir d'un modèle murin mimant la maladie de Crohn.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation in vitro ou ex vivo mais nous avons réduit le nombre d'animaux en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes permettant de limiter au maximum la douleur et la souffrance de nos animaux, en utilisant des cages adaptées et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions de soins ou d'exclusion d'animaux en souffrance. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle et/ou activité physique chez la souris adulte comprenant une étude pilote, qui permettra de définir la dose/durée du traitement au DSS (n= 64 soit n= 24 pour l'étude pilote présentée et n=40 pour le protocole final).

**9025** La préservation et le maintien du capital musculaire squelettique est un enjeu important dans le maintien d'un état de bonne santé mais également en terme de dépense de santé publique. En effet, le muscle squelettique représente le principal réservoir d'acides aminés (AA) pouvant être mobilisés pour assurer l'homéostasie et la survie de l'organisme en cas de situations pathologiques ou d'événement agressif. La perte du capital musculaire, quelle que soit son origine (pathologique ou vieillissement), résulte d'un déséquilibre entre la vitesse de synthèse et de dégradation des protéines du muscle squelettique. Le maintien de la masse protéique musculaire ou la récupération de son capital musculaire suivant un état d'atrophie dépend donc de la capacité des AA alimentaires à stimuler de façon maximale l'anabolisme protéique. Ainsi, l'anabolisme post-prandial doit donc être étendu, ce qui nous conduit à proposer une étude cinétique de l'effet d'un repas test. Des études précédentes chez le miniporc en état catabolique ont montré des modifications du métabolisme protéique (mesuré par perfusion de traceurs) mais aucune donnée n'est disponible concernant les modifications métaboliques ayant lieu au niveau moléculaire dans le tissu musculaire. L'objectif de l'étude est donc d'explorer le métabolisme musculaire postprandial au niveau moléculaire (transcriptomique) et dans un état catabolique.

Le modèle catabolique choisi sera le traitement aux glucocorticoïdes (dexaméthasone) donné par voie orale. Ce modèle est aujourd'hui bien caractérisé puisqu'il génère une résistance du muscle à l'insuline et aux AA, deux paramètres impliqués dans la génération de l'anabolisme musculaire.

Les animaux utilisés seront 7 mini-porcs Yucatan femelles issues d'un protocole précédent.

Au cours de l'expérimentation 2 jours de prélèvements musculaires et sanguins (afin de déterminer le phénotype clinique) seront organisés. Une semaine avant de débiter l'expérimentation, les animaux seront adaptés à recevoir des repas similaires aux repas tests.

Le premier jour d'expérimentation, les prélèvements seront réalisés en condition standard (sans traitement aux glucocorticoïdes). Les biopsies musculaires seront réalisées avant la distribution du repas test (T0) puis 6h après l'ingestion celui-ci (T=360 min) sous une anesthésie générale de courte durée. Des prélèvements de sang périphérique (à l'aide d'un cathéter temporaire jugulaire) seront également faits sur ces mêmes intervalles de temps.

Le second jour de prélèvement sera organisé 2 à 3 semaines après les 1ères biopsies afin de permettre une cicatrisation complète et un arrêt du processus inflammatoire. Ces secondes biopsies et prélèvements de sang en cinétique seront effectués au même temps que les premières (T0 et T360) et après un traitement oral aux glucocorticoïdes (Dexaméthasone 0.4 mg/kg/j) de 7 jours.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale, réduisant au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour la réalisation du projet. En effet, les animaux (7) sont utilisés dans un schéma expérimental longitudinal, où les mêmes individus sont utilisés comme leurs propres témoins. De plus, la totalité des animaux ont déjà été utilisés dans un autre protocole, ce qui répond à la règle de réduction. Par ailleurs, les protocoles appliqués au projet sont adaptés aux interventions chirurgicales

mineures (pose de cathéter temporaire et biopsie), avec une anesthésie générale légère et des traitements locaux visant à réduire l'impact des gestes invasifs.

**9026** Les anévrysmes de l'aorte thoracique (TAA) sont caractérisés par une dégradation de la matrice extracellulaire et une disparition des cellules musculaires lisses (CML) du média conduisant à une dilatation et une fragilisation de la paroi vasculaire. La rupture brutale de l'aorte est alors létale et aucun traitement n'est pour l'instant disponible pour ralentir la progression de la pathologie, en raison de connaissances insuffisantes sur les mécanismes impliqués. Le syndécan-1 est un protéoglycane transmembranaire exprimé par les CML pour lequel nous avons observé une augmentation de l'expression dans le média d'aortes humaines pathologiques versus saines. Nous souhaitons désormais comprendre le rôle que le syndécan-1 pourrait jouer in vivo dans l'évolution de la pathologie. Pour cela, nous souhaitons comparer les souris déficientes en syndécan-1 et les souris non porteuses de cette déficience à l'aide de 2 modèles expérimentaux de TAA : un modèle chirurgical pour lequel nous avons besoin de 320 souris, et un modèle de pompes de délivrance d'angiotensine 2 pour lequel nous avons besoin de 80 souris. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et analgésie avec un suivi post-opératoire. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les critères de traitement pour soulager l'animal et/ou les critères d'arrêt finis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance inutile. Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie. Nous réduirons au maximum le nombre de souris opérées, tout en nous assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. Des expériences ont été menées in vitro afin de remplacer autant que possible l'utilisation de ces animaux. Cependant, la complexité des mécanismes à l'origine des TAA requiert l'utilisation d'un organisme complet.

**9027** Les polyomavirus, du fait de la démonstration de leurs propriétés oncogéniques chez l'animal, ont longtemps été suspectés d'être impliqués dans la carcinogénèse chez l'Homme. Cependant, les études menées depuis une quarantaine d'années n'ont pas fourni de preuves convaincantes d'une association avec des cancers humains.

En 2008, un nouveau membre de cette famille, le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV), a été isolé dans un cancer cutané rare mais agressif. Ce carcinome cutané est décrit comme indolore par les cliniciens. A la suite de cette découverte, il a été montré que l'infection par ce virus est très répandue dans la population et que seule une faible proportion des infections évolue vers un carcinome à cellules de Merkel (CCM).

L'objectif du projet est d'évaluer l'impact d'un anti-VEGF chez des souris ayant reçu des cellules tumorales humaines. L'ensemble du projet représente l'utilisation de 75 souris. Dans un premier temps, afin de valider l'efficacité de ce traitement administré en monothérapie, 30 souris recevront par injection sous-cutanée des cellules tumorales humaines. Quinze souris recevront des injections de Bevacizumab (anti-VEGF) par voie intrapéritonéale trois fois par semaine (dose de 2 mg/kg) et les quinze autres serviront de témoin (injections par voie intrapéritonéale trois fois par semaine de PBS). Dans un second temps et afin de se rapprocher de l'utilisation de ce type de thérapie dans d'autres cancers, le Bevacizumab sera associé à une chimiothérapie. Pour cela, 45 souris recevront par injection sous-cutanée des cellules tumorales humaines. Quinze souris recevront des injections de Bevacizumab selon le même régime, quinze souris recevront le Bevacizumab combiné à une chimiothérapie et les quinze autres serviront de témoin avec des injections de PBS.

L'euthanasie des souris sera pratiquée huit semaines après l'injection des cellules ou en cas de développement de tumeur d'un diamètre supérieur à 0.5 cm ou d'apparition d'ulcération.

La règle des 3R a été respectée comme suit :

Réduction : Afin de réduire le nombre de souris, une seule dose de Bevacizumab et de chimiothérapie sera testée au regard de la dose préconisée dans d'autre type de cancer.

Raffinement : Les souris seront dans des cages enrichies avec des maisonnettes en plexiglas et du papier absorbant. Du fait du statut immunodéficient des souris, l'ensemble du matériel d'enrichissement sera stérilisé. Les souris reçoivent une anesthésie gazeuse au moment de l'implantation des cellules tumorales.

Remplacement : l'utilisation d'un modèle souris est strictement nécessaire pour évaluer l'impact de ces molécules sur la croissance tumorale in vivo avec toute la complexité du vivant.

**9028** Les protocoles décrits visent à étudier les mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer et à déterminer l'impact de facteurs modulateurs sur ces mécanismes. La progression de la pathologie suivant un schéma stéréotypé selon les connexions anatomiques, ces études nécessitent de nouveaux modèles ex vivo permettant de reproduire les différentes lésions/anomalies retrouvées dans le cerveau des patients atteints par cette affection neurodégénérative. Afin d'étudier les mécanismes de cette propagation, il est nécessaire de combiner au sein de ces modèles (1) les réseaux neuronaux propres à différentes régions du cerveau et (2) la physiopathologie de la protéine Tau. Dans cette optique nous souhaitons développer un nouveau modèle basé sur des cultures organotypiques de tissus cérébraux chez lesquelles des isoformes normales et anormales de la protéine Tau seront surexprimées. Notre projet répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. En effet, les études menées selon ces procédures permettront de diminuer le recours aux modèles in vivo. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre unité sur les 5 ans à venir est estimé à 1700 (850 souris et 850 rats) incluant animaux nécessaires aux accouplements et les petits résultants, utilisés avant le sevrage.

Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Les animaux présentant un des points limites spécifié pour chaque approche expérimentale seront euthanasiés dans une salle dédiée; le tout en lien avec le responsable du bien-être animal.

**9029** Beaucoup de patients ayant un retard mental présentent des défauts d'interaction sociale. Ces dysfonctionnements comportementaux, que l'on retrouve en particulier dans les troubles autistiques, pourraient être dus à un manque de plaisir à interagir socialement. En d'autres termes, les liens sociaux ne seraient pas ressentis comme une récompense lors de l'intégration de cette information par le cerveau.

Dans le cerveau, le circuit lié à la récompense semble jouer un rôle majeur dans la motivation et les interactions sociales. Ce circuit contient diverses structures dont le Noyau Accumbens (NAc), appartenant au Striatum Ventral.

Nous cherchons à comprendre comment le Noyau Accumbens est impliqué dans les dysfonctionnements du comportement social. Cette structure comporte deux voies principales, la voie directe et la voie indirecte. Celles-ci se différencient par la population de neurones exprimée ainsi que par la structure sur laquelle elles projettent. Nous nous intéressons au rôle de la voie indirecte, population de neurones exprimant le récepteur D2 à la Dopamine. Le but est d'observer les changements de plasticité synaptique au niveau du NAc chez des modèles de souris autistes, en étudiant la morphologie des épines dendritiques de ces neurones. Nous essaierons également d'identifier les gènes exprimés différemment, au travers du séquençage d'ARN messager, chez des souris présentant des altérations du comportement social par rapport aux souris contrôles.

L'étude utilisera plusieurs lignées de souris :

2 modèles murins présentant des déficits d'interactions sociales : 1° des souris sauvages traitées ou non avec un antagoniste ocytocinergique, dont les interactions sociales sont diminuées; 2° des souris sauvages dont l'expression de la protéine synaptique Shank sera réduite par utilisation de lentivirus shRNA spécifiques. Une diminution de l'expression de Shank ou des mutations de cette protéine sont connue pour induire des phénotypes autistiques.

1 lignée exprimant une protéine fluorescente sous contrôle d'un promoteur spécifique des cellules MSN de la voie indirecte, souris *Drd2-GFP*, pour étudier la morphologie de ces neurones

1 lignée exprimant une sous unité ribosomale taguée sous contrôle d'un promoteur spécifique des cellules MSN de la voie indirecte, souris *Drd2-Cre / RiboTag-flox* pour caractériser les messagers ARN activement transcrits.

Dans un premier temps, nous allons valider le phénotype de ces modèles, c'est à dire vérifier que ces souris présentent des dysfonctionnements sociaux au travers de deux tests comportementaux :

- Un « test d'interaction social à 3 chambres », qui permet d'évaluer l'intérêt d'un animal pour un autre congénère plutôt que pour un objet. Test non invasif.
- le « Conditionnement par Préférence de Place » ou CPP. Ce test permet d'évaluer la motivation de l'animal face à un objet, ou une situation vue comme une récompense, ici il s'agit donc d'évaluer son niveau d'indifférence face aux interactions sociales. Test non invasif.

Puis nous testerons l'état motivationnel plus global des souris pour d'autres récompenses grâce aux tests de « comportement opérant pour du chocolat » et le « Conditionnement par Préférence de Place » pour la cocaïne.

Nous étudierons la morphologie des neurones, par immunofluorescence de la protéine GFP exprimée dans les neurones de la voie indirecte du Nac pour corrélérer ou non des changements morphologiques au comportement social des souris.

Enfin nous séquencerons les ARN messagers associés aux ribosomes dans ces neurones, c'est à dire les ARNm traduits, pour comprendre par analyse différentielle entre les souris seines et celles présentant des défauts d'interactions sociales, quels pourraient être les mécanismes moléculaires sous-tendant le comportement social.

Ainsi, nous souhaitons mettre en avant les différents acteurs et phénomènes de la voie indirecte impliqués dans les troubles comportementaux retrouvés chez les sujets autistiques.

Nous utiliserons un total de 148 souris, tous génotypes confondus.

Nous nous engageons à suivre la règle de 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacer : La souris reste le modèle de choix pour les expériences proposées. Néanmoins nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations ex vivo avec 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 neuronale in vivo; ii) rapporteurs d'activité post-mortem iii) contenu protéique de régions spécifiques du cerveau.

Raffiner : Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales, en utilisant des techniques limitant au maximum l'impact sur l'animal et en prenant toutes précautions visant à limiter la souffrance de l'animal.

**9030** Dans le cadre de notre plateforme d'imagerie équipée d'une IRM dédiée aux études précliniques, plusieurs équipes de recherche nous contactent afin de mener des études sur l'évolution ou les modifications du fonctionnement cérébral de leurs modèles animaux.

L'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) est une méthode non invasive et non irradiante qui permet d'accéder à la connectivité fonctionnelle cérébrale basée sur la détection des changements d'oxygénation du sang dépendant de l'activité cérébrale. On distingue deux types d'IRMf : avec stimulation et sans stimulation. Dans ce dernier cas, on parle d'IRMf de repos. Elle est basée sur la détection et la corrélation de la variation du signal IRM au cours du temps dans différentes structures cérébrales permettant d'obtenir le réseau fonctionnel par défaut. Si les examens cliniques se font sur patients éveillés, les expériences en préclinique sur rongeurs se font essentiellement sous anesthésie afin de minimiser le stress mais aussi d'assurer la qualité des images en limitant les mouvements. Malheureusement, les produits anesthésiques utilisés ont tous un impact sur les résultats en IRMf du fait de leur mécanisme d'action rendant les résultats obtenus plus difficiles à interpréter surtout dans le cas de l'IRMf de repos.

Pour cette raison, plusieurs équipes ont commencé à mettre au point des procédures de conditionnement pour l'acquisition d'IRMf de souris et de rats éveillés. Cela permet en plus de se rapprocher des conditions cliniques, de limiter l'exposition à des anesthésiques pour les animaux. Ces procédures consistent à une phase d'entraînement aux conditions expérimentales sur plusieurs jours permettant à l'animal de s'habituer à rester dans un endroit confiné et chauffé, dans le noir, en présence du bruit induit par l'IRM.

Aussi bien pour améliorer le bien-être de l'animal que la fiabilité de nos résultats, nous souhaitons mettre au point dans nos locaux cette procédure totalement non invasive pour l'animal. En parallèle

de ces essais d'IRM sans anesthésie, dans le cas d'études utilisant des animaux beaucoup trop anxieux pour éviter l'usage de l'anesthésie, nous souhaitons adapter deux nouveaux protocoles d'anesthésie décrits dernièrement dans la littérature afin d'assurer des acquisitions IRM dans les meilleures conditions pour l'animal tout en assurant la meilleure qualité des données IRM.

Selon les projets de recherche, différentes souches sont utilisées, connues pour être plus ou moins faciles à conditionner. Pour cette raison, nous prévoyons d'établir ces deux procédures, sans ou avec anesthésie, à partir des principales souches de souris (C57Bl6, BALB/c, SWISS) et de rats (Wistar, Lewis et Sprague-Dawley) à différents âges (4 stades différents de développement). 1440 animaux au total seront donc utilisés pour la mise en place de protocoles adaptés à un examen IRMf sans ou avec anesthésie.

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

-Réduire : Nous n'utiliserons que 20 animaux par groupe, 20 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité inter-individuelle. De plus, l'imagerie nous permettra de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner : En dehors des examens IRM, les animaux sont surveillés quotidiennement et ont accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Ils sont hébergés dans un environnement enrichi permettant la formation de groupes sociaux. Toutes injections ou tous prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie à l'isoflurane afin de réduire au maximum le stress et les douleurs de l'animal.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des animaux car l'objectif du travail est de mettre au point la procédure de préparation de l'animal à un examen IRM sans ou avec anesthésie.

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, adéquat pour les petits effectifs.

**9031** Le rôle du système immunitaire dans la prévention et le contrôle des cancers a été clairement établi, ce qui a conduit à de nombreuses approches immuno-thérapeutiques dont certaines ont conduit à des résultats très prometteurs, améliorant la survie et qualité de vie des patients. L'objectif de l'immunothérapie anti-tumorale est de stimuler les cellules immunitaires de façon à ce qu'elles reconnaissent et détruisent spécifiquement les cellules cancéreuses. Paradoxalement, cette immunité anti-tumorale protectrice se heurte dans beaucoup de cas à de multiples mécanismes d'échappement mis en place par les cancers. En particulier, les cancers sont capables de convertir la fonction antitumorale protectrice de différentes populations de cellules immunitaires en les transformant en cellules à activité pro-tumorale, favorisant le développement et la dissémination des tumeurs.

L'objectif de ce projet, est de déterminer, en utilisant des modèles de cancer murins établis, représentatifs de cancers humains et avec lesquels notre équipe a précédemment publié, l'influence de l'environnement tumoral sur la fonction et la stabilité de différents sous-types de cellules immunitaires appelés lymphocytes T. Nos objectifs principaux sont ainsi 1) de définir comment les cancers peuvent reprogrammer le système immunitaire en sa faveur et 2) d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques basées sur la manipulation de sous-populations lymphocytaires spécifiques.

L'utilisation de modèles de cancers murins est indispensable à ces études et ne peut être remplacée par des approches alternatives : en effet, la simplicité des systèmes de culture in vitro n'est pas adaptée et ne permettrait pas la génération de résultats interprétables puisque ne prenant pas en compte les multiples et complexes interactions cellulaires et facteurs solubles impliqués dans la régulation du système immunitaire. De plus, ces systèmes in vitro ne permettent pas l'évaluation de l'influence du microenvironnement tumoral généré par une tumeur en développement in vivo. Nous avons envisagé la possibilité d'utiliser des modèles d'insectes ou des systèmes non-vertébrés, mais ces organismes ne possèdent pas les cellules immunitaires retrouvées chez les mammifères, rendant impossible une extension des résultats à l'Homme. De plus, nous disposons de souris déficientes pour des composants importants du système immunitaire nous permettant d'appréhender de façon unique leur implication dans ce contexte.

Nous demandons, pour réaliser l'ensemble de nos expériences 2225 animaux sur 5 ans. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. De plus, les organes prélevés seront partagés entre les différents protocoles. Afin de

respecter la notion de raffinement, le bien être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts et les points limites sont définis afin de prévenir la douleur et l'angoisse des animaux.

**9032** Le septum médian est une région profonde du cerveau qui établit des connexions avec l'hippocampe - la région du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. On pense que les connexions avec le septum médian peuvent lui permettre de changer la façon dont les mémoires sont formées et rappelées surtout par l'action d'un type spécifique de cellules cérébrales connues sous le nom de cellules cholinergiques. Nous envisageons d'employer une technique utilisant la lumière qui nous permettra de mesurer comment ce type de cellule fonctionne et donc d'étudier son rôle dans l'apprentissage et la mémoire.

Dans ce projet nous utiliserons un nombre total de 137 souris. La lignée transgénique "Chat Cre" sera utilisé et n'a pas de phénotype dommageable.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises : (1) Le même animal sera utilisé pour les différents protocoles utilisant la lumière et mesurant l'activité électrique afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris (réduction). (2) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés. Les protocoles ont été développés et raffinés par les membres du laboratoire depuis plusieurs années pour maximiser la simplicité et l'efficacité réduisant ainsi la souffrance des animaux. De plus les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de l'étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture antalgique (Lidocaïne en local et buprénorphine en sous-cutanée) qui permettra une limitation de la douleur pendant et après le réveil de l'animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les zootechniciens et les expérimentateurs avec une surveillance renforcée après la chirurgie et la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires si besoin. Des points limites sont définis et décrits dans les procédures pour éviter la souffrance des animaux. (raffinement). (3) Les modèles de remplacement in vitro actuellement disponibles ne récapitulent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas d'étudier les mécanismes de communication au sein du réseau de neurones.

**9033** Contexte : Pour satisfaire les besoins énergétiques élevés des ruminants à haut niveau de production, comme la vache laitière, des rations riches en glucides rapidement fermentescibles (GRF) sont classiquement utilisées. Ce type de ration, peut concourir à créer un dysfonctionnement du rumen (de type acidose), caractérisé par une diminution du pH du rumen et une augmentation de la production en acides gras volatils, avec comme conséquences un impact négatif sur les performances, la santé et le bien-être des animaux. Outre ces effets, certains travaux suggèrent que l'acidose pourrait aussi générer des modifications de l'équilibre acido-basique du sang et de l'état inflammatoire de l'animal. Pour limiter les effets négatifs de ces rations acidogènes, des probiotiques peuvent être incorporés dans la ration alimentaire. Leur utilisation vise à modifier l'équilibre des populations microbiennes dans le rumen afin d'orienter le faciès fermentaire vers la formation de produits finaux de la digestion plus bénéfiques pour le métabolisme de l'animal. Parmi les probiotiques, l'effet positif des levures vivantes *Saccharomyces cerevisiae* sur les performances zootechniques des bovins de boucherie et laitiers a largement été démontré mais les résultats restent variables selon les conditions expérimentales : souche et dose de levures, stade physiologique de l'animal mais aussi nature et composition de la ration. Des interactions existent entre les levures vivantes et la composition quantitative et qualitative de la ration distribuée aux animaux, mais des études doivent encore être mises en place pour 1/ mieux préciser les situations nutritionnelles pour lesquelles l'utilisation des levures vivantes peut être efficace et 2/ mieux comprendre le mode d'action des levures vivantes dans un milieu biologique aussi particulier et complexe que le rumen.

Hypothèses :

L'analyse quantitative d'une base de données interne montre que certains descripteurs de la ration comme la teneur en sucres solubles influencent le niveau d'efficacité des levures vivantes. L'objectif de l'essai est d'étudier l'effet d'un apport oral de levures vivantes sur les paramètres ruminiaux, sanguins et urinaires de vaches en lactation recevant deux rations différant par leur teneur en sucres

solubles mais potentiellement acidogènes. L'essai sera réalisé sur 8 vaches laitières de race Prim'Holstein, porteuses d'une canule au niveau ruminal, seule méthode disponible pour une connaissance exhaustive et correcte du fonctionnement du rumen. En effet, cette technique permet un accès direct au rumen, indispensable dans le cadre du projet. Elle est choisie car les techniques alternatives disponibles (en particulier la ruminocentèse ou le prélèvement par sonde œsophagienne) ne permettent pas de fournir des résultats satisfaisants tout en causant le moins possible de douleur, de souffrance et d'angoisse pour l'animal. Huit vaches sont nécessaires pour pouvoir réaliser une analyse statistique correcte des résultats. Les prélèvements de liquide ruminal seront réalisés uniquement via la canule, afin de mesurer les paramètres du métabolisme du rumen (paramètres physico chimiques comme le pH et le potentiel redox; paramètres fermentaires comme les acides gras volatiles, l'ammoniaque et l'acide lactique ; paramètres microbiologiques). Des prélèvements ponctuels de sang et d'urine seront aussi effectués pour évaluer l'état acido-basique et inflammatoire de l'animal. Les animaux seront logés dans une installation agréée pour l'expérimentation, afin de leur assurer des conditions de confort et de bien-être. L'étable est munie d'une ventilation dynamique, les vaches disposent de matelas à eau afin de leur assurer des conditions de confort et de bien être pendant toute la durée du projet. Par ailleurs, une surveillance biquotidienne des animaux est mise en place pendant toute la durée du projet.

**9034** La dermatite de contact est une maladie provoquée par des substances au contact de la peau. C'est une maladie sous-diagnostiquée chez le chien car souvent confondu avec d'autres maladies cutanées.

L'objectif de ce projet est de mettre en place plusieurs protocoles pour induire une dermatite de contact à un type d'allergène donné afin d'évaluer l'impact de l'allergène sur l'animal ainsi que la réaction d'hypersensibilité chez le chien.

La dermatite de contact à l'haptène, bien que peu fréquente chez le chien, existe. Ce modèle permettra de confirmer les données démontrées chez l'homme, tant sur le plan de la pathogénie que sur celui du traitement (traitements utilisant les micros ou nanoparticules).

Une dermatite de contact sera mise en place, celles aux protéines comme la protéine de *Dermatophagoides farinae* ou la protéine d'origine alimentaire. D'autres modèles seront également utilisés (comme l'oxazolone). En effet, le chien est la seule espèce animale qui présente une dermatite atopique (DA) spontanée semblable, sur les plans clinique et pathogénique, à celle de l'homme. Contrairement à la dermatite de contact à l'haptène, la DA du chien est extrêmement fréquente, avec des formes graves entraînant une altération profonde de la qualité de la vie du chien ainsi que de celle des propriétaires.

Cette étude permettra, d'une part de vérifier certaines données obtenues uniquement dans le modèle murin expérimental et de tester un traitement basé sur l'application de micro ou nanoparticules. Dans un second temps, cette étude permettra d'approfondir les connaissances de la DA du chien et d'explorer le rôle des allergènes alimentaires dans le déclenchement ou l'aggravation de celle-ci, en particulier la voie de pénétration de l'allergène alimentaire. Enfin, cette étude permettra de tester de nouvelles alternatives thérapeutiques pouvant être une avancée notable par rapport au traitement de référence qu'est la ciclosporine.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'autre méthode permettant d'évaluer l'impact d'une molécule étrangère sur un organisme entier. Cette étude clinique nécessite de travailler sur un modèle animal. En effet, il est possible de mimer la DA spontanée du chien, en réalisant, chez cette espèce, une délamination de la couche cornée juste avant l'application d'un allergène.

Pour ce projet, Il est envisagé d'utiliser au maximum 15 chiens, pour l'obtention de données basales sur la peau et sur la mise au point du modèle afin obtenir une exploitation statistique des résultats.

Ces études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des chiens. Les chiens seront hébergés, individuellement, avec un collier élisabéthain afin d'éviter tout léchage de la zone d'application de la molécule testée, le moins de temps possible. Par ailleurs, les chiens seront quotidiennement sociabilisés et auront à disposition des jouets dans le but d'éviter tout stress. De plus, des mesures seront prises pour prévenir toute atteinte de l'état général des animaux lors du développement de la dermatite de contact.

**9035** Depuis les dix dernières années, de nombreuses découvertes montrent l'importance de la composante génétique dans la plupart des maladies et facteurs de risque cardiovasculaires. Chez l'homme, le chromosome 9 comporte une région d'ADN non codant (qui ne contient pas de gènes) située à proximité de gènes contrôlant par exemple la multiplication ou la mort des cellules. Des modifications de l'ADN de cette région non codante sont associées à des maladies cardiovasculaires (comme les anévrysmes de l'aorte abdominale, les anévrysmes cérébraux, l'athérome carotidien, les calcifications coronaires ou l'infarctus du myocarde), sans qu'on puisse expliquer pourquoi. De plus, il est à noter que les patients atteints par ces maladies présentent souvent une modification de la coagulation et de la paroi de leurs artères qui deviennent plus rigides.

Pour mieux comprendre les mécanismes associant les modifications de la région non codante du chromosome 9 à l'augmentation de la fréquence des maladies cardiovasculaires, des souris génétiquement modifiées ont été créées. 70 kb d'ADN non codant ont été enlevés de leur chromosome 4, correspondant chez l'homme, à la région d'ADN non codante du chromosome 9. Ces 2 séquences d'ADN semblable à 50% et l'ordre des gènes à proximité est conservé dans les 2 espèces. Les manipulations génétiques sur l'homme n'étant pas possible, cette souris représente un bon modèle d'étude.

L'objectif de ce projet est de déterminer si la souris génétiquement modifiée présente une altération de la coagulation du sang et de la rigidité artérielle par rapport aux souris sauvages entre 3 et 6 mois. Afin de limiter le nombre d'animaux, les souris de ce projet qui auront été manipulées de manière non invasive (procédure 1 : mesure consciente de la pression artérielle à la queue et procédure 2 : l'échographie vasculaire) seront ensuite réutilisées pour les expériences invasives mesurant la coagulation sanguine et les propriétés mécaniques des artères (procédure 3 : thrombus physiologique induit par une coupure ; procédure 4 : thrombus induit chimiquement ; procédure 5 : étude de la mécanique vasculaire ; procédure 6 : mesure du temps de saignement à la queue) après lesquelles les souris seront mises à mort. Toutes les procédures, excepté la procédure 1, seront réalisées sous anesthésie pour limiter la douleur. Les animaux seront maintenus à 37°C grâce à une platine chauffante et à une lampe chauffante. La température corporelle et la fréquence cardiaque de l'animal seront vérifiées. De plus, dès que possible, les études in vivo seront remplacées par des études in vitro (sur des cellules).

Il est prévu d'utiliser 160 souris au total : 50 souris sauvages et 50 souris génétiquement modifiées de façon homozygote (les 2 copies de la région non codante sont enlevées) pour l'étude et 60 souris hétérozygotes (n'ayant qu'une seule copie de la modification génétique) seront dédiées à l'apprentissage et les ajustements des procédures 2, 3, 4, 5, 6.

La reproduction se fera à partir de deux couples de souris hétérozygote. Toutes les souris seront génotypées et tatouées sous anesthésie. Toutes les procédures se feront dans une pièce différente de celle de l'hébergement. Les souris seront hébergées entre 1 et 5 (maximum) par cage individuellement ventilées mesurant 36 x 15 cm avec libre accès à la nourriture et à l'eau. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

Un certain nombre de points limites sont définis :

Si la souris est blessée à cause d'autres souris, elle sera isolée (Bétadine) dans une cage pour éviter que la plaie ne s'aggrave et soignée.

Si la souris présente une posture inhabituelle ou de souffrance (se recroqueville dans un coin, isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, Immobilité, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation) ou respire anormalement et si une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours est observée alors nous mettrons à mort pour éviter la souffrance.

**9036** Le cancer pancréatique reste l'un des plus grands challenges médicaux actuels du fait de son très mauvais pronostic et le manque de moyen thérapeutique.

L'utilisation d'ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) a montré son potentiel dans le cadre du traitement du cancer du pancréas localement avancé. Cependant, le risque de lésion artérielle obstructive demeure important, pouvant causer des complications graves.

Il est donc nécessaire de développer un moyen simple et fiable de mesure du flux sanguin lors des tirs HIFU afin de prévenir tout risque d'obstruction artérielle.



Ce projet présente donc deux objectifs qui seront abordés lors de deux étapes successives :

1 - Adapter les paramètres de traitement HIFU afin de permettre l'acquisition d'images Doppler durant l'émission HIFU.

2 - Tester ces nouveaux paramètres sur des vaisseaux sanguins (vaisseaux portes et sus-hépatiques) de différents diamètres afin d'observer d'éventuelles modifications sur les images Doppler en cas d'occlusion.

S'agissant d'une étude chirurgicale, il est impératif de pouvoir valider le raisonnement au cours d'un geste chirurgical dans des conditions similaires à celles qui seront utilisées chez l'homme à terme.

L'étude s'effectue sans réveil et les procédures chirurgicale, anesthésique et analgésique utilisées sont calquées sur celles réalisées en routine chez l'Homme au bloc opératoire.

Au maximum, quatorze porcs seront nécessaires pour réaliser le nombre de lésions statistiquement significatif permettant de valider le traitement.

**9037** Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui se manifeste par des plaques rouges présentant des squames blanches. Cette inflammation est associée à une prolifération accélérée des cellules de l'épiderme, les kératinocytes. Cette maladie chronique touche 2 à 4 % de la population, autant d'hommes que de femmes. Le psoriasis peut être socialement handicapant et, actuellement, il n'existe aucune cure pour cette pathologie. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont utilisées avec des efficacités variables pour réduire les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients. Les corticoïdes sont fréquemment utilisés. Toutefois, ce traitement présente des effets indésirables. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes immuns impliqués dans la formation et le développement des lésions cutanées caractéristiques du psoriasis est la condition sine qua non pour proposer des nouveaux traitements plus efficaces.

L'objectif de ce projet est de mieux connaître l'implication de l'immunité adaptative, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la sévérité de l'inflammation cutanée et de tester l'effet d'un nouveau traitement sur cette pathologie. Des résultats récents indiquent que ce traitement inhibe la prolifération des kératinocytes pouvant ainsi réduire la sévérité de l'inflammation cutanée. Le traitement est sans toxicité, puisqu'il est couramment utilisé chez l'homme mais en dehors du contexte du psoriasis.

Les modèles cellulaires ne pouvant pas refléter la complexité de la pathologie humaine et les interactions cellulaires au niveau de la peau, la souris est considérée comme le meilleur modèle animal permettant d'étudier ce processus inflammatoire. De plus, l'utilisation de souris modifiées génétiquement nous permettra d'appréhender le rôle spécifique de certaines populations de lymphocytes T et de déterminer l'effet du produit sur ces populations.

Ce projet se déroulera sur 2 ans et nécessitera au total 320 souris. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Un effort important sera fait pour assembler les expériences afin qu'un même groupe de souris puisse être utilisé comme contrôle pour deux expériences réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Nous diminuerons au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie et des traitements antalgiques sont prévus. Une grille d'évaluation des points limites a été établie et, si ces paramètres sont atteints, une mise à mort anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront non seulement de mieux comprendre les mécanismes immuns impliqués dans la sévérité du psoriasis mais également de tester un nouveau traitement avec des actions potentiellement thérapeutiques sur le psoriasis.

**9038** L'infarctus du myocarde (IM) aigu demeure aujourd'hui une cause majeure de mortalité et morbidité dans le monde. Le conditionnement ischémique à distance (RIC) est une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à induire de brèves séquences d'ischémie-reperfusion (I/R) au niveau d'un tissu ou d'un organe à distance du cœur. Il permet de réduire les lésions d'I/R dans l'IM aigu. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sont encore mal compris. Le RIC est associé à une diminution de clustérine (CLU) plasmatique chez les patients. La CLU est une protéine chaperonne extracellulaire présente dans tous les fluides biologiques. Elle neutralise les effets cytotoxiques de molécules associées à l'inflammation (comme DAMP (Danger Associated Molecular Pattern)) et

présente une activité anti-apoptotique. Parmi les DAMPs, des travaux ont montré que CLU neutralise l'effet cytotoxique des histones extracellulaires dans le cas de choc septique. Plusieurs travaux ont montré que CLU a un rôle protecteur vis-à-vis des lésions secondaires à l'I/R. Ainsi, l'expression de CLU est augmentée dans les zones soumises à une ischémie expérimentale. Les souris invalidées pour CLU et soumises à une I/R cérébrale ou rénale développent des lésions plus sévères et une cicatrisation pathologique. Cependant, peu d'études ont examiné le rôle de CLU dans l'I/R myocardique. Nous nous interrogeons sur le rôle protectrice de CLU par son effet chaperonne sur les histones dans le cas de l'infarctus myocardique ainsi que son rôle comme médiateur des effets bénéfiques du RIC. Notre objectif est donc d'étudier le rôle de CLU dans l'I/R myocardique et son implication dans la cardioprotection induite par le RIC. Nous analyserons, dans un modèle d'IM le taux sérique de CLU ainsi que de nucléosomes à différents temps pendant l'I/R. Cette étude sera réalisée chez la souris qui est un modèle de choix pour l'IM aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. Nous étudierons également l'effet de l'administration des histones en premier temps ainsi que du CLU en deuxième temps sur la taille de l'infarctus. Des souris KO pour CLU (-/-) et leurs congénères contrôle (wild type +/+) seront nécessaires pour vérifier les résultats obtenus. Dans une seconde partie du projet, nous étudierons l'implication de CLU dans la cardioprotection induite par RIC. Enfin, une dernière partie examinera in vitro sur cardiomyocytes isolés de coeur de souris CLU -/- et WT la viabilité cellulaire après hypoxie/réoxygénation. 354 souris au total seront utilisées pour ce projet. Le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux. Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Nous utiliserons un anesthésique et un analgésique aux doses appropriées (pentobarbital sodique 90mg/Kg et buprénorphine 0.1mg/Kg). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'IM aigu.

**9039** Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes. Dans une étude précédente nous avons mis en évidence ces troubles moteurs dans un modèle murin (Souris traitées de façon prénatal avec un composé tératogène : l'acide valproïque (VPA)) des TSA. De plus, nous avons observé chez ce modèle une perte de neurones dans le cervelet et le cortex moteur, régions du cerveau impliquées dans la fonction motrice. L'objectif du projet est d'utiliser deux modèles animaux des TSA pour mieux comprendre l'implication des dysfonctionnements des régions motrices du cerveau dans les TSA.

Dans un premier temps le projet propose de caractériser les neurones du cervelet de nos animaux modèles des TSA afin de mieux comprendre/identifier l'origine de leur dysfonction. Dans un second temps, nous utiliserons une méthode pour activer les cellules du cervelet chez nos animaux modèles des TSA afin de recouvrer un comportement moteur et social normal. L'ensemble des données collectées au cours de ce projet pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soigner les TSA.

Afin d'être en conformité aux règles 3R :

1) Remplacer : Le projet vise à corriger les dysfonctionnements moteurs et cognitifs des modèles animaux des TSA et à comprendre les mécanismes sous-jacents aux déficits comportementaux observés. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

2) Réduire : (i) Nous utiliserons des protocoles expérimentaux utilisés en routine dans le laboratoire qui nécessitent peu ou pas d'optimisation, (ii) nous utiliserons les mâles et les femelles pour notre étude et collecterons le maximum d'échantillons possible afin d'extraire le plus d'information par animal sacrifié, (iii) des calculs de puissance statistique ont été utilisés pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives.

3) Raffiner : Nous mettrons tout en œuvre pour réduire l'inconfort des animaux (Ex : habituation à l'expérimentateur, utilisation d'anesthésiques...) et nous utiliserons des tests comportementaux simples, ludiques et précédé d'une période d'acclimatation à l'environnement des tests.

Ainsi, d'après nos estimations le nombre total des animaux utilisés pour cette étude est de 625 (165 (géniteurs + animaux surnuméraires) et 460 pour les procédures expérimentales).

**9040** La maladie de Parkinson (MP) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui ne touchent rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans qui se caractérise par une perte d'une population de neurones, ceux à dopamine. C'est un réseau de structures cérébrales, appelés ganglions de la base (GB) qui contrôle l'exécution du mouvement volontaire et qui dysfonctionne dans la MP lorsque la dopamine vient à manquer dans le cerveau. Dans ce réseau, la région du globus pallidus joue un rôle prédominant dans l'exécution et l'arrêt des actions motrices, mais son fonctionnement reste mal compris en particulier comment il est connecté avec le reste des régions qui sont responsable de la motricité. Pour étudier ces connexions, nous souhaitons utiliser un modèle murin transgénique dans lequel nous pourrions étudier par la technique d'ontogénétique, (cette technique consiste à injecter des molécules capables de se fixer sur certaines catégories de neurones pour les stimuler ou les inhiber) deux types de connexions différentes dans le cerveau des animaux. Ce modèle murin transgénique sera obtenu par croisement de deux lignées transgéniques Cre combinase existantes déjà qui ne montrent aucun phénotype dommageable.

Ce projet concerne donc la création de lignées de souris transgéniques par croisement. Nous vérifierons ces modifications géniques ne provoquent pas de phénotype nocif, dans les croisements générés avec ces 2 lignées Cre combinase. La création de ces croisements nécessitera au maximum 192 animaux (tous génotypes confondus). Pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé le plus possible pour ne produire que les animaux nécessaires. Si le constat d'un phénotype nocif est fait, les mesures spécifiques seront prises pour le bien être de ces animaux en définissant des points limites suffisamment précoces pour éviter toute souffrance inutile. Il n'existe pas pour l'heure de méthodes alternatives pour répondre aux questions scientifiques que permettra d'aborder l'utilisation des croisements générés dans ce projet.

**9041** Le développement de la nanomédecine permet d'envisager des traitements anticancéreux mieux ciblés, plus efficaces et avec de moindres effets secondaires par rapport aux traitements conventionnels. L'utilisation de nanoparticules activables à distance par un rayonnement lumineux dans le proche infrarouge permet de contrôler l'action thérapeutique à la fois dans le temps et dans l'espace. Le projet propose l'évaluation d'une thérapie anticancéreuse localisée par échauffement de nanoparticules sous rayonnement électromagnétique non ionisant, (lumière dans le proche infrarouge ou champ magnétique alternatif) en association ou non avec une chimiothérapie ou immunothérapie. Cette évaluation sera réalisée sur un modèle murin (souris Balb C) après injection sous cutanée ou intrapéritonéale de cellules murines de cancer du colon (CT26). L'échauffement de la tumeur sera modulé par la puissance du laser/champ magnétique et réduit aux zones d'accumulation des nanoparticules. La biodistribution des nanoparticules sera suivie par Imagerie Photo acoustique, dont le principe est de détecter l'onde sonore résultant du faible échauffement local des nanoparticules sous l'effet d'un laser. Le même principe d'échauffement sous laser est donc utilisé pour l'imagerie non invasive des nanoparticules (Imagerie Photo acoustique) et pour l'activation des nanoparticules dans un but thérapeutique (Hyperthermie Thérapeutique). Pour la thérapie, la température sera monitorée en temps réel par caméra infrarouge afin de réduire les risques de brûlure dans les zones saines tout en maintenant une élévation de température contrôlée dans la zone tumorale. On visera une hyperthermie modérée (42°C à 45°C pendant 30 min, répétée 3 fois à 24h d'intervalle au moins) de manière à moduler thermiquement le microenvironnement tumoral et le rendre plus permissive aux chimiothérapies ou à l'immunothérapie. L'évolution de la masse tumorale sera suivie par échographie, modalité qui est intégrée au module d'Imagerie Photo-acoustique (sous anesthésie).

Les nanoparticules utilisées seront à base de carbone (nanotubes de carbone et graphène) ou à base d'or et d'oxyde de fer (nanohybrides) et seront camouflées ou non dans une membrane biologique afin de modifier leur biodistribution et augmenter leur accumulation tumorale.

En complément des études d'efficacité in vivo chez la souris, nous testerons l'innocuité à long terme des nanoparticules utilisées, en déterminant leur biopersistance et en identifiant leurs produits de dégradation et leur éventuelle toxicité à long terme jusqu'à un an après injection chez des souris saines. L'imagerie photo acoustique permettra un suivi longitudinal de la biodistribution/dégradation/élimination de nanoparticules utilisées, en complément des caractérisations ex vivo. L'utilisation de cette technique d'imagerie non invasive combinée à la

mutualisation de tissus pour les caractérisations ex vivo permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. L'effet antitumoral et la dégradabilité de nanoparticules utilisées in vivo seront au préalable testés et optimisés in vitro sur des modèles cellulaires 2D ou 3D ou encore dans des milieux mimant l'environnement biologique (remplacer). Enfin l'hébergement, les soins et l'ensemble des procédures expérimentales sur les animaux seront effectués dans le respect du bien-être animal avec la définition de points limites au-delà desquels l'expérience sera interrompue (raffiner). L'objectif final est d'identifier les nanomatériaux de meilleur potentiel thérapeutique associé une biodistribution favorable, biodégradable et sans effet indésirable à long terme. Cette étude nécessitera l'utilisation de 1174 souris.

**9042** La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie caractérisée notamment par une accumulation de plaques beta-amyloïdes (peptide Aβ). A l'heure actuelle, aucun médicament n'est disponible et les recherches s'orientent vers différentes pistes, notamment le développement d'un médicament qui pourrait empêcher la formation de plaques beta-amyloïdes. Parmi ces médicaments potentiels, sont décrits dans la littérature l'utilisation d'un polyphénol nommé le resvératrol. Ainsi un autre polyphénol, la viniférine pourrait être testée en remplacement du resvératrol.

En effet, une étude in vitro sur cellule a permis de démontrer que la viniférine inhibait la formation des plaques beta-amyloïdes et qu'elle induisait la désagrégation de ces plaques avec une meilleure efficacité que le resvératrol. De plus, une autre étude a montré que l'injection intrapéritonéale hebdomadaire de viniférine pendant 15 semaines chez des souris transgéniques « Alzheimer » conduisait à une réduction de la taille des plaques et de la densité de ces plaques.

Notre projet a pour but de comparer les effets in vivo du resvératrol et de la viniférine sur la formation de ces plaques amyloïdes. Pour cela nous proposons de quantifier par imagerie de Tomographie par Emissions de Positons les plaques beta-amyloïdes dans notre modèle de la MA chez des souris traités avec la viniférine ou le resvératrol. De plus, une imagerie de la neuroinflammation des animaux sera aussi réalisée. Les résultats obtenus par imagerie seront ensuite corrélés à la quantification ex vivo de la charge amyloïde globale et des dépôts amyloïdes (plaques).

Nous nous attendons à ce que la viniférine inhibe la formation des dépôts amyloïdes et la neuroinflammation associée plus efficacement que le resvératrol.

Remplacement : Ce type d'étude ne peut être substitué par une méthode alternative in vitro ou sur cellules car l'objectif final est d'utiliser ces mêmes molécules à visée thérapeutique en clinique humaine.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe sociaux avec présence d'un enrichissement (tunnel et Nestlets).

Toutes les stratégies d'analgésie, d'anesthésie et de soin seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par le modèle.

Réduction : L'utilisation de la méthode d'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons), réalisée de manière non traumatique chez l'animal vivant, permettra d'explorer chez chaque animal, à la fois la charge amyloïde et la neuroinflammation, sans nécessité de multiplier les groupes expérimentaux pour étudier ces deux paramètres.

Pour cette étude nous utiliserons 30 animaux pour l'ensemble du projet sur 2 ans.

**9043** Dans la population, les cancers des os sont rares (0,2% de l'ensemble des tumeurs malignes) comparé aux cancers des tissus mous. L'ostéosarcome est le type de tumeur osseuse le plus répandu (45%), suivi par le chondrosarcome (17 à 24%).

Les ostéosarcomes touchent préférentiellement les adolescents et les jeunes adultes. L'ostéosarcome localisé est traité par poly-chimiothérapie pré- et post-opératoire et chirurgie. Les ostéosarcomes métastatiques sont fréquents et sont associés à de plus mauvais pronostiques. Malgré les avancées dans la prise en charge thérapeutique, les taux de survie à 5 ans demeurent inchangés depuis 40 ans : 70% pour les formes localisées et seulement 20% pour les patients à haut risque.

Le chondrosarcome de l'os est une tumeur maligne de faible croissance, peu vascularisée produisant du cartilage au lieu de l'os. Celui-ci atteint surtout l'adulte et présente une incidence égale quel que soit le sexe. Selon le site d'occurrence et le grade histologique, il est létal chez 10 à 50% des patients.

Ces tumeurs sont résistantes à tous les traitements actuels, basés sur la chimiothérapie et la radiothérapie conventionnelles. Ce type de cancer est donc incurable à l'heure actuelle lorsque cette tumeur n'est pas opérable (base de la tête) ou qu'elle a métastasé. De nouvelles pistes thérapeutiques doivent donc être explorées pour proposer un espoir aux patients atteints de ces tumeurs osseuses.

L'utilisation de micro-ARNs (miARNs ou miRNAs) comme agents thérapeutiques des cancers pourrait être opportune pour ces types de tumeur. Nous avons mis en évidence trois miRNAs tueurs à la fois de cellules de chondrosarcomes et d'ostéosarcomes, mais pas de cellules saines de cartilage in vitro. La preuve de leur efficacité doit donc maintenant être réalisée in vivo chez l'animal, pour pouvoir transférer cette approche de traitement à la prise en charge clinique des patients. Cependant, le problème majeur de leur utilisation est leur transport jusqu'aux cellules tumorales. Cette étape n'a pas été résolue par le développement de vecteurs viraux et non viraux. Nous proposons de véhiculer ces miRNAs à l'aide de bactéries colonisatrices des ostéosarcomes et des chondrosarcomes.

L'utilisation de bactéries dans la régression de certaines formes de cancer est connue depuis plus d'un siècle. Elles sont capables de s'infiltrer et de coloniser les tumeurs avec une très grande spécificité et peuvent être éliminées par antibiothérapie. De plus, elles peuvent être utilisées comme vecteurs d'agents anti-cancéreux. La capacité des bactéries à synthétiser et véhiculer un miRNA a été démontrée très récemment. Cependant, aucune étude n'a mis en évidence une colonisation bactérienne spécifique des tumeurs osseuses. Par ailleurs, plutôt que d'utiliser des souches bactériennes pathogènes atténuées en virulence, nous privilégions l'utilisation de souches non pathogènes que nous modifierons par Biologie Synthétique pour véhiculer les miRNAs.

En ce qui concerne le chondrosarcome, nous voulons véhiculer le meilleur miRNA sélectionné à l'aide de 2 bactéries colonisatrices du chondrosarcome que nous avons identifiées au préalable dans une étude pilote chez la souris immunodéprimée grâce à un modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain. Ces expériences doivent être validées sur un dernier lot de 7 souris pour chaque bactérie colonisatrice (soit 14 souris) et complétée par des données d'imagerie. Nous devons maintenant faire la preuve de la colonisation bactérienne des chondrosarcomes chez un animal immunocompétent pour plus de pertinence, mais nous ne pouvons pas nous abstenir d'utiliser un modèle de xénogreffe car les miRNAs ont été validés dans un modèle humain de chondrosarcome. Il n'existe pas de modèle de chondrosarcome établi chez la souris immunocompétente. Nous ferons donc la preuve de la colonisation bactérienne dans un modèle de chondrosarcome de rat généré chez le rat immunocompétent, seul modèle de greffe syngénique de chondrosarcome murin existant (2 bactéries x 4 lots de 7 rats + 12 rats donneurs de greffe, soit 68 rats).

En ce qui concerne l'ostéosarcome, la colonisation bactérienne sera évaluée en premier lieu dans un modèle de xénogreffe d'ostéosarcome humain généré chez la souris immunodéprimée. Nous vérifierons si les 2 souches bactériennes colonisatrices de chondrosarcomes colonisent également l'ostéosarcome, et si besoin nous testerons 5 autres souches (7 souris par souche) comme nous l'avons fait pour le modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain (maximum 7 bactéries x 4 lots de 7 souris, soit 196 souris). Dans un second temps, la colonisation bactérienne sera évaluée dans un modèle de greffe syngénique d'ostéosarcome murin généré chez la souris immunocompétente pour la/les meilleures colonisatrices identifiées (2 bactéries x 4 lots de 7 souris, soit 56 souris).

Dans ce projet, la règle des 3R (Réduire-Raffiner-Remplacer) est suivie. A ce stade du projet et des connaissances des tumeurs osseuses, un passage au modèle animal est nécessaire; les limites du remplacement des animaux par d'autres techniques étant atteintes. Il nous faut en effet identifier des bactéries capables de coloniser les tumeurs osseuses in vivo pour les modifier génétiquement afin qu'elles véhiculent les miRNAs sélectionnés in vitro. Du fait de la spécificité de chaque souche bactérienne, les bactéries ne pourront être modifiées qu'après avoir identifiées celles qui colonisent ces tumeurs in vivo. Nous devons donc déterminer les bactéries colonisatrices de chaque modèle tumoral chez l'animal. Concernant le principe de réduction du nombre d'animaux à utiliser, une estimation du nombre minimum d'animaux a été faite. Une puissance statistique suffisante est estimée avec un minimum de 20 animaux pour le groupe traité. Cela correspond à un nombre total maximum de 68 rats et 266 souris, qui permettront d'atteindre une puissance de l'ordre de 80%. Le raffinement des procédures et l'enrichissement du milieu pour tenir compte du bien-être des animaux sont pris en considération dans ce projet, comme détaillé dans le descriptif des procédures à suivre

(acclimatation, surveillance quotidienne, description des anesthésies et des analgésies, personnel compétent formé notamment en chirurgie, prévision des points limites, ajout de matériaux dans les cages).

**9044** Le projet de recherche proposé ici se situe dans le domaine de la recherche expérimentale sur la maladie d'Alzheimer, démence la plus fréquente pour laquelle n'existent à ce jour que des traitements symptomatiques d'une efficacité modérée. Les stratégies thérapeutiques actuellement en développement consistent, d'une part, à favoriser des stratégies multicibles (ciblant différents aspects de la maladie) et d'autre part, au développement de médicaments dits 'disease modifier' (curatifs et symptomatiques). A l'aide de travaux de collaborations menés avec une équipe de chimie thérapeutique, notre projet vise à déterminer la gamme de dose à effet thérapeutique et l'efficacité de nouvelles molécules pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Ces molécules dites MTDL «Multi Target Directed Ligands» possèdent la particularité d'avoir plusieurs sites d'actions : d'une part inhibiteur de l'activité acétylcholinestérasique (à l'instar de l'une des deux classes médicamenteuses utilisées à ce jour) et une cible dite 'disease modifier' (activation des récepteurs sérotoninergiques de type 4 ; 5-HT4R). La co-modulation de ces deux cibles par des substances agissant séparément sur chacune des cibles a été suggérée par de nombreuses études et a démontré une synergie d'action à doses sub-actives. Pour la réalisation de ce projet 440 animaux seront nécessaires (400 transgéniques) et (40 sauvages). Ils seront répartis en 22 groupes de 20 souris servant aux études comportementales (n=12) et de biochimie/biologie moléculaire (n=8). Aucun modèle alternatif ne permet d'obtenir de telles informations, cependant afin de respecter les consignes de réduction et de raffinement de la règle des 3 R, le nombre de souris par groupe a été fixé à 12 maximum (permettant de donner une puissance statistique suffisante aux résultats obtenus); par ailleurs, les tests comportementaux n'engendrent pas per se de douleur, et les traitements pharmacologiques seront effectués avec soins afin d'éviter toute douleur à l'animal. Les procédures d'euthanasies seront quant à elles effectuées sous anesthésie et analgésie afin d'éviter toute souffrance à l'animal.

**9045** Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans le monde, et le vieillissement est un des principaux facteurs de risque. De ce fait, la recherche dans ce domaine est capitale. Un paramètre permet de faire le lien entre vieillissement et pathologies du cœur : l'accumulation progressive de mutations de l'ADN des mitochondries avec l'âge. Les mitochondries sont en quelque sorte les centrales énergétiques de la cellule, et elles forment un réseau tubulaire extrêmement dynamique. Elles possèdent leur propre génome présent en milliers de copies et codant pour l'expression de 13 protéines cruciales. De ce fait, les mutations de l'ADN mitochondrial sont particulièrement critiques. Au cours du vieillissement, les cellules accumulent des mutations de cet ADN, et lorsque celles-ci excèdent un seuil critique, la fonction des mitochondries est dramatiquement affectée. Comme l'accumulation des mutations est un processus lent qui ne se déroule pas à la même vitesse dans toutes les cellules, au sein d'un tissu âgé se trouvent quelques cellules déficientes en activité mitochondriale, entourées de nombreuses cellules fonctionnelles. On parle alors de mosaïque mitochondriale tissulaire. La pertinence physiologique de ces mosaïques sur la fonction des organes au cours du vieillissement restait à démontrer. Nous avons développé un modèle de souris (K320E-TwinkleMyo) capable d'accumuler des mutations de l'ADN mitochondrial dans le cœur de manière accélérée, afin d'étudier les répercussions de ces mosaïques sur la fonction cardiaque. Nous avons pu montrer qu'une proportion faible de cellules déficientes (0,5%) est suffisante pour causer des troubles du rythme cardiaque chez ces souris.

Dans ce projet qui a fait l'objet d'une réflexion approfondie au sein du laboratoire, nous voulons dans un premier temps explorer l'influence de ces mosaïques sur le pronostic d'autres pathologies cardiaques liées à un problème d'oxygénation du cœur (ischémie), qui représentent un véritable problème de santé publique. Dans un second temps, nous déterminerons les répercussions sur le métabolisme général entraînées par la présence de ces cellules déficientes dans le cœur. Enfin, nous chercherons à ralentir l'accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial chez ces souris, en modulant la dynamique mitochondriale, fine balance entre fusion et division des mitochondries, qui joue un rôle dans le contrôle qualité de ces organelles. Ces objectifs nécessiteront des expériences d'ischémie/reperfusion et d'implantation de puces télémétriques sous-cutanées qui seront réalisées

sous anesthésie générale, complétée par une analgésie (pentobarbital sodique 90mg/Kg et buprénorphine 0.1mg/Kg), avec contrôle fréquent de la réponse nociceptive des animaux.

Il y aura 4 lots de souris différents utilisés :

- Contrôles
- K320E-TwinkleMyo
- K320E-TwinkleMyo fusion mitochondriale altérée
- K320E-TwinkleMyo fission mitochondriale altérée

De plus, le phénotype des souris K320E-TwinkleMyo se développant tardivement (arythmies à 18 mois), nous envisageons de réaliser ces expériences sur souris homozygotes pour l'allèle Twinkle muté, ce qui devrait permettre d'accélérer la survenue de ce phénotype et/ou l'accentuer.

Au total 2608 souris seront nécessaires pour ce projet prévu sur une durée de 5 ans. Nous avons calculé ce nombre au plus juste, en gardant à l'esprit la règle des 3R, et en planifiant de réutiliser certains animaux dans plusieurs procédures, autant que possible.

**9046** La prise en charge des cancers cervico-faciaux implique de façon classique un traitement par radiothérapie. Ce traitement a très souvent comme effet secondaire une ostéoradionécrose (ORN) qui affecte la cicatrisation osseuse et est souvent responsable d'un très mauvais pronostic.

Afin de pouvoir tester de nouvelles solutions thérapeutiques pour traiter ces ORN, il est impératif de disposer d'un modèle animal adapté permettant d'évaluer leur faisabilité, leur innocuité ainsi que leur efficacité.

Il s'agit donc dans un premier temps, en se basant sur la bibliographie de finaliser le développement d'un tel modèle chez le lapin reproduisant les symptômes observés chez les patients.

Une fois le modèle validé, nous nous proposons de tester une nouvelle approche thérapeutique des ORN, basée sur une stimulation osseuse par ultrasons.

L'ensemble de ce projet utilisera 70 lapins.

Ce nombre a été déterminé afin de minimiser le recours à l'expérimentation animale tout en préservant l'interprétation statistique de nos résultats.

Enfin, l'ensemble des procédures réalisées (chirurgie, anesthésie, analgésie) ont été validées au préalable et élaborées afin de minimiser la souffrance animale au cours de ce projet.

**9047** Le projet vise à collecter des images médicales (telles que IRM (imagerie par résonance magnétique), CT scan (computed tomography scan), fluoroscopie et échographie) avant, pendant et après la réalisation de procédures de chirurgie mini-invasive (percutanée, laparoscopique ou vasculaire).

Les images collectées seront un support essentiel au développement de simulations numériques permettant de fournir une assistance intra opératoire à travers méthodes de réalité augmentée et de réalité virtuelle. La solution développée pourra par la suite être implémentée en clinique

Le développement de techniques de réalité virtuelle sera utilisé pour le diagnostic, le traitement mais aussi pour l'enseignement et la formation dans le domaine de la santé.

Avant que ces simulations soient utilisables en routine clinique hospitalière, elles doivent être avant tout validées sur des modèles animaux

Images IRM et CT pour obtenir des modèles 3D de l'anatomie

images fluoroscopiques et échographiques pour des données 2D de la physiologie de l'animal ou de la progression d'un instrument chirurgicale dans l'anatomie.

Notre projet a pour objectif la création d'une base de données d'images d'anatomie animale, permettant le développement et la validation de simulations numériques pour la réalité virtuelle en médecine.

Remplacement : Le recours à l'animal vivant est nécessaire pour les acquisitions d'images pré, per et post opératoires. Par le passé nous avons réalisé des expériences sur :

- phantom permettant l'insertion de cathéter, et de simuler la circulation sanguine grâce à l'utilisation d'un circuit hydraulique.

- animaux euthanasiés pour simuler des modèles 3D d'organe. Cependant ces simulations ne tiennent pas compte des déformations en lien avec la respiration, et due à la rigidité cadavérique.

Réduction : Un maximum de 40 cochons sera nécessaire pour mener à bien le projet, afin de permettre la collecte d'une quantité suffisante d'images de différentes modalités. Ce nombre a été

réduit au maximum grâce aux expériences préliminaires réalisées sur des modèles du type phantom et cadavre de cochon.

Raffinement : Afin de limiter les souffrances et le stress généré par la procédure, l'acquisition d'image, pré/intra/post-opératoire sera conduite sous anesthésie générale.

Toute procédure chirurgicale sera effectuée par des chirurgiens experts en chirurgie mini invasive, qui connaissent l'anatomie de l'animal et maîtrisent les techniques de réduction de la souffrance chez l'animal.

Bien qu'en générale, l'acquisition d'image médicale soit sans douleur, toute mesure minimisant la souffrance de l'animal sera adoptée.

**9048** La mélatonine est une hormone sécrétée par la glande pinéale pendant la nuit. Elle est principalement connue pour son rôle central dans la régulation des rythmes jour-nuit, mais elle possède de nombreuses autres propriétés dont un effet bénéfique sur la mémoire et la pathologie des souris modélisant la maladie d'Alzheimer (MA). Le type de récepteur à travers lequel la mélatonine améliore la mémoire vient d'être identifiée et constitue donc une cible thérapeutique pour améliorer les perturbations de mémoire. Des composés activant fortement et sélectivement ce récepteur ont été synthétisés et testés avec succès dans plusieurs systèmes in vitro. Le but de ce projet est de valider cette nouvelle cible thérapeutique chez la souris APPKI tauKI, un modèle de souris de seconde génération doublement humanisée. En effet, les deux principales marques de la MA sont l'accumulation anormale de la protéine tau et du peptide amyloïde qui dérive de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). Les souris APPKI tauKI possèdent un gène de l'APP humain avec deux mutations induisant une forme familiale de la MA et un gène humain normal de tau à la place des gènes correspondant de la souris. La première étape consistera à caractériser la pharmacologie et tester l'innocuité de deux nouveaux composés mimant l'effet de la mélatonine sur le récepteur cible chez la souris normale afin de sélectionner le meilleur candidat. En parallèle, les perturbations de la mémoire et la neuropathologie des souris APPKI tauKI femelles seront évaluées et comparées à celles des mâles en cours de caractérisation. Seuls les mâles sont étudiés à ce jour. Or la population féminine est plus atteinte par la MA que la population masculine. Le troisième volet du projet consistera à tester les effets du composé mélatoninergique le plus efficace sur les déficits de mémoire et la neuropathologie (accumulation cérébrale de tau et du peptide amyloïde) des souris femelles APPKI tauKI. Si le nouveau composé améliore les performances de mémoire et réduit la pathologie de type Alzheimer des souris APPKI tauKI, ce travail ouvrira la voie à une nouvelle voie thérapeutique pour soigner cette maladie dévastatrice.

Ce projet respecte au plus près la règle des 3R :

Remplacer. Les nouveaux composés ont été testés avec succès dans plusieurs systèmes in vitro. Il est désormais nécessaire de les utiliser in vivo pour évaluer leurs effets bénéfiques sur la mémoire, puis sur les pertes de mémoire et la neuropathologie dans un modèle de la MA. L'étude de la mémoire et ses dysfonctionnements liés à ce type de pathologie nécessite encore l'utilisation de l'animal vivant. Les modèles in vitro ou computationnels ne permettent pas d'évaluer les fonctions de la mémoire à la fois dans leurs aspects physiologiques et comportementaux.

Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au maximum : 12 souris par groupe est l'effectif minimal dans une étude comportementale sur la mémoire de reconnaissance permettant de détecter une amélioration des performances dans les tests de reconnaissance qui seront utilisés dans ce projet. Cet effectif permettra de satisfaire aussi aux contraintes des différentes analyses statistiques prévues pour étape du projet. L'ensemble du projet nécessitera au maximum 612 souris. En effet, le projet est construit de façon à minimiser le nombre de souris utilisées en passant d'une expérience à la suivante dès qu'une étape apporte un résultat positif. Ainsi, dans le cas le plus favorable, l'effectif minimal pourrait même être limité à 252 souris.

Raffiner : Les souris bénéficieront toujours d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid, un tube refuge et des boulettes de nourriture à manipuler dans la cage) et d'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe sociaux tout au long du projet. Les différents tests utilisés dans le projet sont basés sur le comportement d'exploration spontanée des souris, sans autre contrainte que d'être mises en présence d'objets dans une grande enceinte (tests de reconnaissance) ou déposées dans un dispositif formé d'une boîte sombre connectée à une



boîte fortement éclairée (test d'anxiété). Les tests d'innocuité consistent en une série d'observations et de manipulations simples et indolores. Le test d'anxiété vient compléter cette observation systématique pour détecter un éventuel malaise, même léger, induit par les nouveaux composés chez les souris. Les souris sont traitées avec un décalage dans le temps qui permet d'interrompre l'expérience dès l'apparition de signes de malaise et éviter ainsi de traiter les souris suivantes.

**9049** Selon le cadrage national, un parcours en Licence dans le domaine de la Biologie doit être délivré suite notamment à un enseignement théorique et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions chez le mammifère et chez l'homme. L'acquisition des compétences requises nécessite donc un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin d'illustrer les concepts majeurs de la physiologie en conditions concrètes et réelles par l'application d'une méthodologie de type recherche scientifique en biologie. Au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, les objectifs d'une licence en Biologie correspondent à la poursuite d'études dans des masters de type biologie-santé impliquant une insertion professionnelle dans des laboratoires de recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et des laboratoires de recherche académique qui nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. En conséquence, l'enregistrement de paramètres biologiques, l'expérimentation animale et la mise en évidence de régulations hormonales ainsi que d'activités pharmacologiques semblent primordiales pour sensibiliser et instruire les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle molécule candidat-médicament.

Afin d'atteindre ces objectifs de formation méthodologique et pratique, les études sont réalisées sur plusieurs séances réparties au premier semestre de la troisième année de licence. Les différentes séances permettent aux étudiants, après une séance de démonstration et d'initiation aux techniques opératoires, de mettre en place sous la forme de projets encadrés des protocoles expérimentaux afin de mesurer et quantifier l'impact des hormones stéroïdiennes (œstradiol et progestérone) sur la réponse contractile de l'utérus de ratte à des substances pharmacologiques utilisées dans la pharmacopée humaine (contracturants ou tocolytiques). Compte tenu des objectifs de la formation, il ne nous est pas possible de remplacer l'expérimentation animale et la chirurgie sur ratte par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer) comme préconisé par la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch. Cependant, les protocoles expérimentaux sont mis en place de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux (réduire). En effet, les étudiants se répartissent en groupe de 4 afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. De plus, les données recueillies lors de la précédente maquette d'enseignement ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales, notamment pour la définition de points de contrôle et limites (comportementaux et physiques), pour l'utilisation d'antalgiques et pour les actes chirurgicaux (raffiner). Selon le nombre d'étudiants, il est prévu d'utiliser au maximum 30 rattes par année universitaire pour ce projet soit un maximum de 120 rattes. Ce nombre est un compromis nécessaire pour répondre aux exigences de la formation en termes d'observation et de pratique technique en accord avec les obligations pédagogiques relatives au diplôme et pour satisfaire au critère de réduction du nombre des animaux en vigueur dans la règle des 3R.

**9050** Les maladies à prion affectent aussi bien l'Homme que l'animal. Ces maladies neurodégénératives, liées à la modification de la protéine du prion (PrP), existent sous une forme sporadique, génétique mais également transmissible. La transmissibilité des maladies à prions humaines (Kuru, maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique) a été démontrée il y a plus de cinquante ans par les équipes américaines du National Institute for Health (ces travaux, pour lesquels Carleton Gajdusek a eu le prix Nobel en 1976, ont servi de base à la définition d'une nouvelle classe de maladies, les protéinopathies).

La variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ), décrite pour la première fois en 1996, est due à la transmission à l'Homme de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), ou maladie de la vache folle, très vraisemblablement par voie orale. Il a été démontré que le macaque cynomolgus inoculé avec du cerveau de bovin infecté par l'ESB présente une pathologie similaire (signes cliniques, lésionnels et biochimiques) à la v MCJ chez l'Homme, conférant à ce primate le statut de modèle le plus pertinent pour modéliser le risque pour l'Homme vis-à-vis de l'ESB.

Suite à la mise en place du dépistage systématique de l'ESB chez les bovins abattus avant d'être consommés, de nouvelles maladies à prion bovines ont été mises en évidence. Par ailleurs, l'émergence de la maladie du dépérissement chronique chez les ruminants sauvages des Montagnes Rocheuses (élan, cerf-mulet) inquiète fortement les autorités sanitaires nord-américaines vis-à-vis de sa possible transmission à l'Homme. La découverte de la maladie chez cinq cervidés en Norvège en 2016 présuppose l'extension de la maladie au continent européen. Chez l'homme, il faut souligner que les cas sporadiques de Maladie de Creutzfeldt-Jakob (environ 100 cas par an en France) représentent 80 % des cas de maladies à prion, dont l'origine dite « spontanée » reste encore inconnue. Les études épidémiologiques n'ont pas pu mettre en évidence de lien entre ces formes humaines et des maladies à prion animales. Néanmoins, la faible incidence de ces maladies et leurs très longues périodes d'incubation ne permet pas d'infirmier un caractère zoonotique à ces maladies animales sur la base de ces études. Ainsi, il a été récemment démontré qu'au moins une souche de tremblante du mouton était transmissible au macaque par voie intracérébrale, suggérant que certaines maladies à prions animales pourraient avoir un potentiel zoonotique, c'est-à-dire la capacité à être transmissible à l'homme.

Selon l'EFSA (European Food Safety Authority, Autorité européenne de sécurité des aliments), l'inoculation expérimentale à un modèle pertinent constitue la seule approche fiable pour statuer quant à l'éventuelle transmissibilité des maladies à prions animales à l'Homme, et déterminer par la suite si des mesures sanitaires particulières doivent être mises en place pour sécuriser le consommateur.

La présente étude a pour but d'évaluer la transmissibilité des différentes maladies à prion animales au macaque cynomolgus, et le cas échéant, d'évaluer le risque de transmission par voie alimentaire. Les incubations des maladies à prions étant très longues au regard de l'espérance de vie de l'espèce considérée (jusqu'à 50 ans chez l'Homme), ces études nécessitent une surveillance des animaux sur plusieurs années. Ces travaux sont par conséquent des études préliminaires basées sur l'exposition d'un nombre d'animaux aussi réduit que possible (deux animaux par voie intracérébrale et deux animaux par voie orale pour chaque souche de prion étudiée, vingt souches de prion identifiées) pour faire la preuve ou non de la transmissibilité de la souche de prion concernée, et servir alors de préambule à des études plus conséquentes le cas échéant. Au total, cette étude portera sur l'exposition de 80 macaques. Des mesures compensatoires d'enrichissement sont mises en place avec la structure de bien-être animal afin de pallier ces longues périodes d'expérimentation indispensables.

Les primates seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents spécifiques des maladies à prions ou de signes de souffrance incompatibles avec une survie dans des conditions décentes, qu'ils soient liés ou non à l'inoculation, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrP sera recherchée dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques pour confirmation du diagnostic clinique établi.

**9051** Le glaucome est une maladie fréquente et grave des yeux. Il affecte plus de 70 millions des personnes dans le monde et fait perdre la vision de plus 8 millions de personnes chaque année. C'est la deuxième cause de cécité toutes causes confondues. Cette maladie est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'humeur aqueuse par le corps ciliaire et son élimination, causant une hyperpression intraoculaire et par la suite des lésions irréversibles de nerf optique.

L'utilisation d'ultrasons de haute intensité (HIFU) est la dernière innovation en matière de traitement du glaucome. Elle vise à réduire la production d'humeur aqueuse par la destruction d'une partie de corps ciliaire de manière précise, rapide et non-invasive. Une des difficultés actuelle est d'évaluer le résultat immédiat : la lésion HIFU est trop petite pour des examens ophtalmologies classiques, et le résultat clinique ne peut se voir que plusieurs semaines après traitement.

Nous avons développé un nouveau concept qui va permettre une évaluation en temps réel des lésions HIFU sur le corps ciliaire. Le but de cette étude est une preuve de concept sur modèle lapin. Le raffinement de nos procédures nous permettra de n'utiliser que 2 lapins pour s'assurer qu'il est bien possible d'évaluer l'effet immédiatement après le traitement. Il n'est pas prévu à ce stade des

études statistiques. La procédure de traitement utilisée, couramment utilisée chez l'homme est indolore, ainsi que la procédure d'évaluation de l'effet (simple mesure physique non invasive).

**9052** Un nouveau Master Biologie ouvre à la rentrée 2018 et propose un parcours de Neurosciences qui vise à apporter aux étudiants une formation de pointe dans différents domaines des Neurosciences. Au vu de notre expertise, nous proposons une unité d'enseignement en Master 2, dans laquelle les étudiants dans le cadre de travaux pratiques évalueront les effets comportementaux de différents psychotropes. Dans cette formation habilitée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, les travaux pratiques proposés permettront aux étudiants d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques dans le domaine des maladies psychiatriques. Les étudiants utiliseront quatre tests comportementaux différents pour mettre en évidence les effets d'un psychotrope (différent chaque année) sur 1) l'activité locomotrice, 2) l'anxiété, 3) le comportement de désespoir et 4) la mémoire. Les animaux seront euthanasiés à la fin de la séance de travaux pratiques et les cerveaux seront récupérés pour être utilisés dans des travaux pratiques d'une autre unité d'enseignement. Le nombre d'animaux utilisés par année d'enseignement sera de 48 animaux : 24 animaux contrôles injectés avec une solution saline, 24 animaux injectés avec un psychotrope. Six animaux par tests comportementaux seront donc utilisés pour un psychotrope et la solution saline. Ces chiffres ont été déterminés de par notre expérience, pour permettre de réaliser une analyse statistique des résultats obtenus. Au travers de ces travaux pratiques, les étudiants acquièrent des compétences techniques et théoriques. Lors de ces travaux pratiques, nous sensibilisons les étudiants aux questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale. Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer raffiner réduire). Ce type de travail visant à comprendre l'effet de différentes drogues ne peut être uniquement mené que sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés. Quel que soit le nombre d'étudiants, le nombre d'animaux par groupe expérimental sera conservé. Pour ces travaux pratiques nous utiliserons 48 souris par an, soit 240 souris pour la totalité du projet. Nous avons cherché à réduire le nombre d'animaux à son minimum, ce qui justifie que nous n'ayons pas utilisé d'approche statistique en amont des expériences pour calculer de nombre d'animaux, car ce nombre serait trop élevé. D'après notre expérience, ce nombre devrait être suffisant pour permettre toutefois une analyse statistique. En effet, le but du TP est de former nos étudiants à ce type d'expériences. Si le nombre d'animaux n'est pas suffisant pour une analyse statistique complète, les données obtenues par les étudiants seront complétées par des données précédemment obtenues au laboratoire.

En ce qui concerne le raffinement, les animaux seront surveillés afin de repérer d'éventuels signes de douleurs/de stress et d'y remédier.

**9053** La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et psycho-comportementaux entraînant une perte d'autonomie. Avec le vieillissement de la population, cette maladie représente un véritable enjeu scientifique, humain, social et économique. Faciliter le diagnostic de la maladie représente un enjeu de santé public majeur.

Déterminer des signes de diagnostic précoce, est indispensable pour le traitement dans les meilleurs délais des patients atteints de la MA.

Dans nos études, nous avons découvert que la souris P301S, modèle murin de la MA, présentait des altérations de la rétine dès l'âge de 2 mois avec l'apparition d'agrégats de protéine Tau, bien avant le début du déclin cognitif (6 mois).

Le but du présent projet est de caractériser le phénotype rétinien de la souris APP/PS1 autre modèle murin de la MA. Nous pourrions comparer les résultats obtenus de ces deux modèles.

Nous réaliserons des images du fond d'œil et de la structure de la rétine à 3, 6, 9, 12, 15 et 18 mois. L'acuité visuelle sera évaluée par des tests optocinétiques aux mêmes âges et la fonction rétinienne évaluée par des électrorétinogrammes. Au total 660 souris seront analysées en incluant les contrôles. L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne de ne peut être mesurée par des tests in vitro.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux seront hébergés dans de cages sur portoirs ventilés avec eau et nourriture à volonté mais sans enrichissement. L'enrichissement tend à ralentir l'évolution de la

maladie ce qui pourrait interférer avec les résultats de l'étude. L'ajout d'une variable difficilement quantifiable entraînerait une augmentation du nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétable, ce qui est contraire au principe de réduction décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne pour les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée pour une surveillance adaptée afin de s'assurer de leur bien-être. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans le présent projet et obtenir des résultats interprétables, toutes les études préalables in vitro nécessaires au projet ont déjà été effectuées et comme expliqué ci-dessus nous avons limité l'enrichissement des cages.

**9054** La transplantation, dernier recours en cas de défaillance d'un organe vital, est une opération lourde. 5746 greffes d'organes ont été effectuées en France en 2015 ce qui représente plus de 15 greffes par jour. Le traitement à base de médicaments immunosuppresseurs permet de diminuer l'intensité des réactions immunologiques de l'organisme contre le greffon mais ces médicaments induisent de nombreux effets secondaires. Dans certains cas, c'est le greffon qui réagit contre l'hôte (Graft versus Host Disease : GvHD). Ainsi, dans les greffes de moelle, les cellules immunologiquement compétentes du donneur réagissent contre les antigènes de l'hôte, aboutissant à des lésions de multiples tissus (peau, tube digestif, foie). Les lymphocytes Treg, capables de contrôler les réponses immunitaires, ont un potentiel clinique majeur dans la prévention du rejet chronique des greffes. Le rôle important des Treg sur la tolérance en transplantation humaine ainsi que dans les modèles rongeurs, a largement été démontré depuis les premiers travaux sur la tolérance infectieuse. L'approche d'une thérapie cellulaire basée sur la génération des cellules Treg modifiées génétiquement (CAR-Treg) permettant un ciblage local de leur activité immunorégulatrice est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre, pourrait apporter une nouvelle approche pour les patients. Au début de l'année 2016, il a été établi dans un modèle xénogénique de GvHD induite par injection de globules blancs humains HLA A2+ chez des souris immunodéficientes que les cellules CAR-Treg humaines dont le récepteur chimérique (CAR) était spécifique de la molécule HLA.A2 étaient plus efficaces que des cellules Treg polyclonales pour réduire l'inflammation liée à la GvHD. Avant de pouvoir administrer chez l'homme, les autorités réglementaires se basent sur un ensemble de données précliniques qui visent à identifier les potentiels risques et à mettre en évidence la preuve d'efficacité de l'approche thérapeutique proposée. Le projet actuel de recherche préclinique s'inscrit dans le développement clinique des CAR-HLA A2-Treg dans le cadre des transplantations. Le projet consiste à évaluer chez la souris NSG le bénéfice thérapeutique des cellules humaines CAR-HLA.A2-Treg dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte induit par des cellules humaines ainsi que de définir la migration, la persistance et le mécanisme d'action de ces cellules dans ce modèle.

Les règles d'expérimentation seront comme suit : (Remplacer) L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité du système immunitaire dans le contexte de réaction GvHD lors d'une greffe de cellules hématopoïétiques. (Raffinement) Les souris cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi. Pendant les études, les animaux seront suivis quotidiennement et l'application de points limites adaptés et précoces permettront de limiter au maximum la douleur. Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation chez l'animal. (Réduction) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Un nombre total de 1217 souris sera nécessaire.

**9055** Les valeurs sanguines des ions doivent être maintenues à l'intérieur d'intervalles étroits, sous peine d'entraîner des désordres plus ou moins graves, parfois mortels. Le rôle principal du rein est de maintenir des valeurs dans des limites acceptables en contrôlant la quantité de chaque ion éliminée dans l'urine. Dans l'exemple précis du calcium, le rein doit pouvoir éliminer plus de calcium si l'alimentation est enrichie en cet ion de manière à éviter une élévation trop marquée de la valeur de

calcium dans le sang. Les mécanismes par lesquels le rein peut s'adapter à une telle situation sont encore discutés. Récemment, une protéine appelée claudine14 (Cldn14) a été impliquée dans cette adaptation, parce que son expression rénale augmente lorsque le régime est enrichi en calcium. Cela étant, la démonstration directe sur tissu natif d'un rôle de Cldn14 dans l'adaptation du rein à un régime riche en calcium n'a jamais été faite et nous ne savons donc pas si cette protéine est réellement importante. Afin de répondre à cette question, nous allons nourrir des souris exprimant (Cldn14WT) ou n'exprimant pas (Cldn14KO) le gène Cldn14 avec un régime contenant une quantité élevée de calcium pendant 5 semaines. Au terme du traitement, la quantité de calcium et de sodium transportée par le segment rénal dans lequel s'exprime Cldn14 sera mesurée in vitro sur tissu fraîchement isolé, obtenu après anesthésie des animaux.

Cette étude sera réalisée chez la souris adulte, mâle : le modèle d'inactivation constitutionnelle du gène Cldn14, nécessaire à cette étude, est un modèle murin.

La règle des 3R a été appliquée du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Toutes les procédures le nécessitant seront réalisées sous anesthésie. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des réabsorptions rénales des ions en fonction des conditions expérimentales, de l'hypothèse que le régime utilisé entraîne une variation de la réabsorption rénale de calcium d'au moins 40 %. Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées (raffinement) et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Quarante animaux (20 KO et 20 WT) sont utilisés dans le projet. Il n'y a pas d'alternative à cette étude, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du tissu rénal intact.

**9056** La rétinite 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 rétiniens 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 700 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 ».

En tenant compte de la règle des 3R, les animaux sont stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté) et le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum. En effet, l'utilisation in vivo de l'imagerie rétinienne et d'une approche d'analyse de la fonction rétinienne (électrorétinogramme) permettra de suivre, par différentes mesures répétées, l'évolution de la dégénérescence rétinienne au cours du temps sur un même animal (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire permet de prévenir la douleur éventuelle due aux

actes chirurgicaux. Une observation régulière des animaux est effectuée pour détecter tout mal-être de l'animal avant le sacrifice en fin d'étude pour un suivi histologique.

**9057** Les chimiothérapies utilisées pour traiter les cancers de l'ovaire sont d'une efficacité limitée à cause de la chimiorésistance développée. Il existe donc un réel besoin dans la mise en œuvre de traitements efficaces.

Nos travaux ont pour objectif de contribuer à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique personnalisée des cancers de l'ovaire. Nous cherchons à identifier les cibles les plus appropriées, à valider les outils thérapeutiques les plus adaptés in vivo et à définir des facteurs prédictifs. Il est donc primordial de s'appuyer sur des modèles expérimentaux qui reflètent de façon pertinente la pathologie.

Le projet présenté ici vise à établir un panel de modèles de tumeurs ovariennes dérivées de patientes ou Patient-Derived xenografts (PDX). Les PDX sont mises en place à partir de fragments de tumeurs de patientes obtenus lors de l'exérèse de la tumeur ou suite à une biopsie tumorale et implantés chez la souris immunodéprimée, puis maintenus in vivo par passage successifs de souris en souris. Ces modèles conservent les caractéristiques morphologiques, moléculaires et une hétérogénéité tumorale proches de celles de la tumeur d'origine du patient.

L'objectif est d'établir 30 modèles de PDX afin de pouvoir disposer d'une cohorte représentative de l'hétérogénéité intra- et intertumorale de la maladie.

3 souris seront utilisées pour greffer des fragments de la pièce d'exérèse en sous-cutanée. La tumeur sera maintenue sur 5 passages toujours en sous-cutanée. L'excédent de matériel tumoral au cours des différents passages sera à la fois cryopréservé, inclus en paraffine et congelé afin de créer une tumorotheque et de permettre la caractérisation moléculaire et histologique de ces tumeurs à différents passages.

D'après la littérature, le taux de prise des tumeurs de l'ovaire est supérieur à 60% lorsque les animaux sont greffés par voie sous-cutanée. Au total, nous aurons besoin de 1560 animaux pour l'établissement des 30 PDXs et pour évaluer leur réponse aux agents anticancéreux habituellement utilisés en clinique pour le traitement des cancers de l'ovaire. Même si le passage à l'animal est nécessaire pour permettre la mise en place de modèles expérimentaux pertinents, un soin particulier a été porté au respect du principe de la loi des 3Rs ; notamment par l'utilisation d'un modèle ex vivo de tranches de PDXs (Réduction) pour cribler les molécules testées, par la mise en place d'un test de décongélation pour permettre de conserver les modèles sur une longue période sans utiliser d'animaux (Réduction), et par l'utilisation de méthodes limitant la souffrance des animaux (Raffinement).

Les animaux seront euthanasiés et les tumeurs prélevées avant que la taille des tumeurs ne puisse gêner le bien-être des animaux. D'autre part, une souffrance visible liée au développement tumoral sera considérée comme point limite, de même qu'une détresse caractérisée par une perte de poids supérieure à 20% ou une prostration de l'animal. Ces points limites donneront lieu à l'euthanasie de ces animaux au système immunitaire déficient (prérequis indispensable à l'implantation de cellules tumorales d'origine humaine). Cette euthanasie sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

**9058** Le but de cette étude est d'évaluer l'absorption dermale et l'excrétion de la radioactivité chez le rat après une application dermale unique d'un composé radiomarqué.

Cette étude permet de connaître la fraction du composé d'intérêt qui est susceptible de traverser la peau et d'atteindre la circulation sanguine. Les quantités stockées dans la peau sont également déterminées.

L'utilisation d'un traceur radiomarqué ( $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ ) permet d'avoir une information exhaustive : molécule inchangée et ses métabolites.

La règle des 3R est appliquée comme décrit ci-dessous :

- Remplacer : un autre modèle n'est pas applicable dans la mesure où ces études rentrent dans le cadre d'études réglementaires obligatoires pour le développement de certains composés : Guidance OCDE 427.

- Réduire : Le nombre minimum utilise est défini par la même Guidance : au moins 4 animaux par groupe doivent être inclus pour chaque dose testée (en général : 2 ou 3) et chaque temps étudié (en général : 3 ou 4). Pour chaque étude, entre 24 et 48 rats sont utilisés.
  - Raffiner : une procédure de point limite est en place au laboratoire pour chaque étude et bien spécifiée dans les plans d'étude.
- Sur 5 ans, un total de 480 rats sera utilisé.

**9059** Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France et reste la première cause de décès par cancer avec plus de 11 000 décès en 2015. 70% des patientes présentent un cancer du sein hormono-dépendant dont le traitement de référence est l'hormonothérapie. Cependant malgré l'efficacité de ces molécules, la résistance à ces traitements constitue un problème majeur de santé publique. De nombreuses études ont montré que la présence de cellules souches cancéreuses ou l'activation de voies de signalisation, telle que la voie PI3K/Akt/mTOR, sont impliquées dans la résistance à l'hormonothérapie. Nos expériences passées dans le cadre d'un autre type de cancer, les léiomyosarcomes, ont montré que le ciblage de cette voie de signalisation seul ou en association avec un inhibiteur des cellules souches cancéreuses apportait un réel bénéfice quant à l'éradication des cellules cancéreuses que ce soit in vitro ou in vivo dans un modèle animal. Nous souhaitons donc transposer ces résultats au cancer du sein qui est une pathologie qui s'y prête particulièrement au vue des données bibliographiques. Les résultats in vitro sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires sont très encourageants et nous souhaitons poursuivre cette étude in vivo chez le petit animal afin de confirmer l'intérêt d'utiliser ces molécules dans le cancer du sein.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : l'oncogenèse est un modèle intégré qui fait intervenir un grand nombre de mécanismes physiologiques et de tissus avoisinants qui ne peuvent être modélisés in vitro. Nous devons donc avoir recours à un modèle physiologique complet et fonctionnel.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Le suivi longitudinale des animaux par imagerie permet également de réduire le nombre des animaux.

Raffinement : Le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort, les animaux seront hébergés en groupe et l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Les animaux recevront une surveillance quotidienne et des soins adaptés (administration d'analgésiques et anesthésiques en pré et/ou post-opératoire, mesure hebdomadaire du poids des souris et du volume tumoral, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

Nous aurons besoin pour réaliser l'ensemble de nos expériences de 530 souris immunodéficientes sur 2 ans.

**9060** La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision. Elle se caractérise sur le plan clinique par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet suivie de la diminution de fonction des photorécepteurs à cône jusqu'à la cécité. A ce jour, même si différents mécanismes ont été décrits, aucun traitement n'a prouvé son efficacité sur le long terme. D'où l'importance d'identifier de nouveaux mécanismes et donc de potentiels nouvelles cibles thérapeutiques.

Le système S joue un rôle essentiel dans la protection contre le stress oxydant.

Dans ce projet, nous voulons démontrer l'importance du système S au niveau de la rétine de l'œil.

Des études préliminaires in vitro sur des cultures cellulaires rétinienne, ont démontré que le système S jouait un rôle crucial dans la survie des cellules. A ce jour, nous devons prouver que ce rôle est effectif chez l'animal.

Dans la première partie de ce projet, nous vérifierons les données préliminaires que nous avons obtenues in vitro en bloquant le système S via deux molécules inhibitrices chez l'animal (souris sauvage C57Bl6). La structure de la rétine sera analysée par imagerie in vivo (micron III, OCT, SLO) et la fonction rétinienne par un électrorétinogramme.

Si nous obtenons les résultats escomptés dans la première partie de ce projet, nous initierons la seconde et la troisième partie.

Dans la seconde partie du projet, nous compléterons l'alimentation en l'élément M afin de voir si nous observons une neuroprotection chez des modèles animaux de rétinite pigmentaire communément utilisés par la communauté scientifique (la souris rd1 et le rat P23H).

La troisième partie du projet sera de tester trois molécules thérapeutiques chez la souris rd1 (une après l'autre en fonction des résultats). Les études de la rétine pour les parties 2 et 3, seront réalisées de la même façon qu'à la première partie de ce projet.

Au total, 400 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles, dont 370 souris et 30 rats.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne ne peut être mesurée par des tests *in vitro*. Les études préalables *in vitro* ont déjà été effectuées.

Les rats et les souris seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux seront hébergés dans des cages sur portoirs ventilés avec eau et nourriture à volonté. L'enrichissement sera adapté au modèle animal (bâton à ronger uniquement afin de ne pas ralentir le processus de dégénérescence des photorécepteurs qui deviendrait une variable difficilement quantifiable et entraînerait une augmentation du nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables, ce qui est contraire au principe de réduction décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les maisonnettes et la cellulose sont des endroits où les animaux peuvent se cacher de la lumière. L'absence de lumière ralentit l'évolution de la RP.

Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière de ces derniers est effectuée pour s'assurer de leur bien être. Afin de limiter le nombre d'animaux, nous avons effectué des études préliminaires *in vitro* et comme expliqué ci-dessus nous sommes amenés à limiter l'enrichissement des cages. Le nombre d'animaux utilisé dans le présent projet a donc été réduit à son strict minimum pour obtenir des résultats interprétables et atteindre l'objectif scientifique décrit.

**9061** La gestion de l'état de santé des personnes âgées soumises à des situations de stress physique aigu constitue un enjeu majeur de santé publique pour notre société. Plus spécifiquement, les interventions chirurgicales pour des fractures du col du fémur chez les seniors est une préoccupation sanitaire majeure, touchant chaque année plus de 1.6 millions d'individus avec un coût économique estimé à plus d'un milliard d'euros par an pour la France seule. Les seniors faisant face à ce type d'intervention chirurgicale s'exposent à un haut risque d'état inflammatoire chronique conduisant à une altération de l'homéostasie cellulaire des systèmes neuromusculaires et immunitaires, et ayant pour conséquence d'affecter de manière très importante la qualité de la vie et l'autonomie de ces patients. Ce phénomène est ainsi associé chez les plus de 75 ans à un décès pour 3 patients dans l'année suivant l'intervention. Il apparaît donc essentiel de créer des outils de diagnostic, notamment des marqueurs biologiques, permettant de prédire et d'anticiper la capacité de récupération des patients après l'acte chirurgical. Les données préliminaires que nous avons obtenues soulignent que les patients âgés qui ne survivent pas à cette intervention chirurgicale présentent une signature caractéristique de marqueurs pro-inflammatoires, et notamment une élévation anormale des niveaux circulants de néoptérine. Dans ce contexte, l'objectif de notre projet est de déterminer dans un modèle pré-clinique murin quel est l'impact direct d'une exposition chronique à des niveaux élevés de néoptérine sur l'état de santé de populations âgées, et dans un second temps de tester des stratégies thérapeutiques pour limiter ces altérations. La littérature scientifique étant néanmoins très peu fournie concernant les effets biologiques de la néoptérine chez l'homme et le rongeur, il apparaît néanmoins préalable de mettre un point un modèle expérimental élevant de manière chronique la néoptérine circulante chez le rongeur et induisant des altérations fonctionnelles.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Ainsi, 12 animaux seront utilisés dans ce projet et hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages de groupes de 3 animaux. De plus, les cages sont munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit. Le



Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées (Raffinement). Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure (Réduction). Ce modèle expérimental in vivo est nécessaire pour comprendre les changements physiologiques au sein de différents organes en interaction et ne peut être remplacé par un modèle in vitro (Remplacement).

**9062** En Oncologie et en Neurologie, le développement de nouvelles molécules requiert l'étude de leurs propriétés/activité dans des modèles animaux mimant la maladie chez l'homme car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles in vitro (par exemple de culture cellulaire) pouvant mimer totalement ces pathologies. Cependant, avant de tester l'efficacité de ces molécules, il est important de déterminer chez l'animal sain les doses maximales pouvant être administrées, ceci afin de limiter l'utilisation d'animaux et de s'assurer de leur bien-être. Il est nécessaire de conduire des courtes expériences permettant de limiter les doses utilisées à des doses efficaces et surtout qui ne conduisent pas à l'apparition d'effets toxiques en fonction des voies d'administration utilisées.

Ce projet a donc pour but de proposer une stratégie adaptée aux projets de recherche menés en Oncologie et en Neurologie afin de conduire des études de tolérance qui seront réalisées en amont des études d'efficacité. Cette stratégie est similaire à celle des études cliniques de phase 1 chez l'homme (sujets sains) qui permet d'évaluer la tolérance d'une molécule en déterminant la dose maximale recommandée et la dose maximale tolérée. Celles-ci permettront de tester la molécule dans des études de phase 2 (patients) de manière sécurisée pour évaluer son efficacité. Etant donné que les molécules ont des cibles et des propriétés différentes en Oncologie et en Neurologie, les procédures expérimentales sont séparées.

Les études de tolérance sont réalisées sur souris ou rats en fonction des modèles utilisés pour les études d'efficacité. Les produits peuvent être administrés par différentes voies (sous-cutanée, intramusculaire, orale, intraveineuse...). Pour certaines voies d'administration jugées plus invasives donc douloureuses (par exemple nécessitant une incision cutanée), les animaux seront anesthésiés par anesthésie gazeuse. Les animaux sont hébergés en groupe avec enrichissement (matériel leur permettant d'exercer leurs instincts naturels) pendant toute la durée de l'étude. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, les différentes doses à tester sont évaluées par ordre croissant et la dose suivante n'est injectée que si la dose précédente a été tolérée après un temps suffisant d'observation. Les observations de signes cliniques (état du pelage, posture...) et de perte de poids sont réalisées avec l'aide d'une grille de points limites objective qui permet de quantifier leur état et ainsi une prise de décision rapide : mise à mort de l'animal et du groupe ou passage à la dose supérieure ou inférieure. Considérant le nombre de molécules à évaluer chaque année, le nombre d'animaux estimé nécessaire pour les 5 ans du projet est de 2160 souris et 1800 rats.

**9063** Malgré des progrès remarquables en matière de prévention et de traitement, le cancer reste une cause majeure de mortalité dans le monde. Depuis quelques années, notre groupe est spécialisé dans le développement de stratégies de chimiothérapies sélectives ciblant les cellules tumorales. Les vecteurs anticancéreux que nous développons véhiculent un médicament vers la tumeur sous une forme non-toxique. Au niveau de la tumeur, le vecteur anticancéreux est reconnu par une enzyme présente dans le microenvironnement tumoral de très nombreuses tumeurs, la beta glucuronidase. Cette interaction entre l'enzyme et le vecteur déclenche une succession de réarrangements dans ce dernier qui conduit à la libération du médicament sous sa forme active.

Dans ce contexte, le projet pluridisciplinaire déposé ici a pour objectif de développer un concept analytique original, non invasif et indolore permettant le diagnostic ultra-précoce de l'ensemble des cancers solides. Inspiré de la stratégie de chimiothérapie sélective que nous avons développée, ce projet repose sur l'administration aux animaux d'une molécule qui sera décomposée au niveau de la tumeur par la beta glucuronidase pour libérer de l'éthanol. Cet éthanol pourra alors être détecté dans l'air expiré par les animaux portant des tumeurs.

Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à

l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc.) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de pouvoir étudier la capacité de notre technologie à détecter les tumeurs chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro (remplacer).

Ainsi, ce projet sera composé de deux procédures expérimentales. Dans la première, nous testerons notre technologie sur la détection de tumeurs greffées sur des animaux. Dans la seconde, nous la testerons sur des animaux qui développent spontanément des tumeurs. Au total, ce projet nécessitera 240 souris (80 pour la première étude et 160 pour la seconde).

**9064** La licence de Sciences du Vivant offre aux étudiants la possibilité d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques dans le domaine de la neurobiologie. Cette filière conduit à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux. Dans cette formation habilitée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, les travaux pratiques proposés en L3 visent à marquer et observer les structures cérébrales utilisant la dopamine comme neurotransmetteur. Au travers de ces travaux pratiques, les étudiants acquièrent des compétences techniques et théoriques de base en neuroanatomie : fixation et coupe de tissu nerveux, immunohistochimie (marquage des neurones dopaminergiques), identification des régions cérébrales par observation microscopique. Lors de ces travaux pratiques, nous sensibilisons les étudiants aux questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale. Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque rat sera utilisé par 4 étudiants. Compte tenu du nombre d'étudiants dans la formation (80 étudiants par an), pour réaliser ces travaux pratiques, nous utiliserons 20 rats par an soit 100 rats pour la totalité du projet (5 ans). En ce qui concerne le raffinement, les manipulations seront effectuées par l'enseignant pour limiter le risque de douleur et prendre toutes les mesures pour le bien être animal

**9065** Les bêta-lactamines sont parmi les antibiotiques les plus prescrits pour traiter des infections bactériennes. Cependant, leur utilisation est menacée par l'apparition d'enzymes synthétisées par les bactéries ( $\beta$ -lactamases : BLs) capables de les hydrolyser et ainsi à les désactiver. Actuellement, la résistance médiée par les BLs n'épargne pas les dernières générations de bêta-lactamines notamment les carbapénèmes. Leur utilisation est actuellement compromise par l'émergence de souches bactériennes produisant des carbapénèmases. La dissémination de ces enzymes est à l'origine d'infections nosocomiales associées à une mortalité élevée, et qui sont, pour l'instant, seulement traitables par un ou deux anti-infectieux réservés au milieu hospitalier et malheureusement peu efficaces. Les carbapénèmases se répartissent en trois grandes classes : A, D et B. L'arsenal thérapeutique contre les classes A et D est aujourd'hui sérieusement diminué tandis qu'aucun traitement efficace contre les classes B n'est connu. Cette situation est donc très préoccupante car les laboratoires pharmaceutiques se sont largement désengagés de ce domaine de recherche peu rentable et peu de nouvelles molécules antibactériennes arrivent sur le marché. Ainsi le contrôle de la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenu un enjeu majeur de Santé Publique, les antibiotiques étant des molécules extrêmement précieuses.

Nous avons récemment conçu deux familles originales d'inhibiteurs de carbapénèmases : i) des azétidinimines (ou imino- $\beta$ -lactames, analogues azotés des antibiotiques de type bêta-lactame), qui ont été préparées par une voie de synthèse originale et ii) des inhibiteurs contenant un motif spécifique. Les évaluations in-vitro et le design in-silico, ont permis la mise au point de dérivés dans ces séries montrant des activités inhibitrices (CI50) intéressantes envers la plupart des carbapénèmases. Certaines de ces molécules présentaient aussi une activité significative in-vitro sur des bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases. Cette capacité d'inhiber simultanément et fortement des carbapénèmases et des  $\beta$ -lactamases structuralement très différentes est une première dans le domaine, qui nous donne un avantage décisif par rapport à la concurrence. La phase de maturation nous a permis d'optimiser de manière rationnelle l'activité biologique et les propriétés physico-

chimiques de ces deux séries de molécules in-vitro avant de réaliser maintenant des essais d'efficacité et de tolérance in-vivo pour 5 de nos meilleurs composés afin de sélectionner un candidat médicament.

654 souris vont être utilisées pour ce projet. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans les groupes afin de détecter des différences entre les traitements. Le remplacement des animaux est impossible car après avoir réalisé les tests d'efficacité in-vitro, l'étape suivante du développement préclinique de ces molécules consiste en une étude in-vivo chez l'animal. En effet aucun modèle in-vitro ne permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres déterminant l'efficacité clinique et la tolérance d'un antibiotique seul ou associé à des inhibiteurs de bêta-lactamases. Pendant l'expérimentation, le raffinement sera pris en compte comme suit : Après l'infection, les animaux vigiles seront placés dans un environnement thermostaté dans des cages présentant une bouillotte et un certain enrichissement (papier absorbant utilisé par les souris pour faire des caches), avec libre accès à la nourriture et à l'eau et la luminosité contrôlée avec alternance veille/sommeil. Les conditions d'asepsie lors de l'administration de l'inoculum et des traitements seront préservées et les souris seront surveillées régulièrement (au minimum 2 fois par jour) pendant toute la durée de l'expérimentation.

**9066** Les troubles envahissants du développement, dont les troubles du spectre autistique (TSA) sont associés à des dysfonctionnements du comportement, de la cognition et de la perception. Un nombre croissant de preuves associe aussi depuis peu les TSA avec des troubles moteurs complexes, dont l'ataxie. Plusieurs cliniciens vont jusqu'à proposer que ces déficits moteurs peuvent être prédictifs des TSA surtout qu'ils semblent apparaître avant les troubles comportementaux et cognitifs. De nombreuses études chez l'humain ont montré une association entre le diagnostic des TSA et un dysfonctionnement du cervelet. Le cervelet tient un rôle majeur au sein de la fonction motrice volontaire, notamment dans l'intention d'exécuter un mouvement, la coordination des mouvements, l'apprentissage moteur et l'équilibre. Son altération pourrait expliquer certains des symptômes observés chez les patients atteints de syndrome autistique tels que les troubles tonicoposturaux et psychomoteurs, les stéréotypies motrices et les anomalies dans le maintien du regard. Dans le cervelet, les cellules de Purkinje sont le centre intégrateur de l'information, elles jouent donc un rôle central dans la régulation de la fonction motrice. En effet, plusieurs études post mortem chez l'humain ont montré une diminution du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet de patients souffrants de syndrome autistique et ceci a également été reporté chez des modèles animaux. Il est donc primordial d'étudier le fonctionnement de ces cellules et leur implication dans le développement de certaines pathologies telles que l'autisme.

L'objectif de ce projet est d'établir un modèle de dégénérescence précoce des cellules de Purkinje du cervelet chez des souris C57/Bl6 afin d'étudier par la suite son effet sur le développement cérébral, en caractérisant le comportement des souris et en identifiant les réseaux neuronaux impliqués, ce qui n'a jamais été réalisé auparavant.

Nous émettons l'hypothèse que cette perte cellulaire dans cette région du cervelet peut être responsable des troubles moteurs observés dans les TSA, voire même des déficits d'interaction sociale du fait du rôle cognitif du cervelet. Ce projet pourrait donc aboutir à un nouveau modèle animal des troubles du spectre autistique et permettre de mieux comprendre l'étiologie de cette pathologie psychiatrique neurodéveloppementale. Ainsi, cette caractérisation pourrait également ouvrir une nouvelle voie dans le diagnostic quantitatif de ces troubles et suggérer des nouveaux moyens thérapeutiques.

Les modèles animaux de souris dans ces pathologies se sont révélés d'une grande utilité car ils permettent une étude horizontale allant de l'observation comportementale à l'analyse des réseaux neuronaux et la détermination des messagers chimiques sous-jacents. La souris, et plus spécifiquement la souche C57/Bl6, est très utilisée comme modèle animal de troubles neurologiques et psychiatriques. De plus, l'utilisation de cette espèce ouvre la porte à l'utilisation de souris transgéniques portant des mutations spécifiques en phase avec notre projet de recherche sur l'autisme. Les rongeurs sont à ce jour les espèces modèles de petite taille ayant un système moteur proche de l'Homme. Les souris (*Mus musculus*) ont l'avantage d'être un modèle de choix pour les études comportementales.

Une attention particulière est portée afin d'être en conformité aux 3R.

Remplacer : Les symptômes cliniques des TSA sont de nature comportementale (cognitive et motrice). De ce fait, la nécessité de modèles animaux apparaît essentielle à l'étude de cette pathologie. Ces approches nécessitent la présence du réseau neuronal qui est uniquement accessible dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

Réduire : (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux avant toute expérimentation, (ii) nous avons entrepris de réduire au maximum le nombre d'animaux en planifiant des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre à nos objectifs scientifiques. (iii) Nous mettons en place des tests statistiques performant : ANOVA multi factorielle (âge, sexe, traitement) suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur comme celui de Newman-Keuls que nous employons régulièrement pour ce type d'études.

Raffiner : (i) nous avons planifié nos expériences en gardant à l'esprit la nécessité de réduire sinon de soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux, et (ii) dans le but d'obtenir plus d'informations pertinentes à moindre coût en terme de "mal être" animal. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

Ainsi, et d'après nos estimations, nous aurons besoins de 262 animaux.

**9067** La recherche de notre équipe est d'analyser les bases cellulaires de l'hyperémie fonctionnelle, c'est à dire le lien entre l'activation cérébrale et l'augmentation réflexe du flux sanguin, lien qui est à la source de l'imagerie fonctionnelle cérébrale de type fIRM chez l'homme.

Notre but est donc de caractériser l'ensemble des types de cellules cérébrales (tels les neurones ou les cellules gliales) participant à la régulation de ce phénomène.

Plus précisément, nous projetons d'étudier, dans le bulbe olfactif et le cortex du rongeur anesthésié ou éveillé, les réponses calciques cellulaires et vasculaires à la présentation d'odeur ou à la photoactivation. Nous poursuivrons cette étude dans des modèles pathologiques.

Sur le plan technique, nous observerons ces réponses en utilisant la microscopie bi-photonique, l'imagerie ultrarapide ultrasonore (ultrafast ultrasounds) et l'électrophysiologie.

Ces expériences seront effectuées après craniotomie et pose d'une fenêtre d'observation en verre, en plastique transparent ou en silicone.

Nous vérifierons si les résultats obtenus restent valables au niveau du néocortex.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles. Notre approche, limitera le nombre d'animaux utilisés dans la mesure où les réponses cérébrales seront enregistrées simultanément avec plusieurs techniques. Nous pourrons alors utiliser des tests statistiques basés sur des observations paires, tels les « Paired test » ou « paired Wilcoxon signed rank test ».

Il n'existe pas de méthode alternative possible. L'étude du couplage neurovasculaire impose l'utilisation de certains mammifères. Seule la souris est une espèce chez laquelle il est aisé de générer des animaux transgéniques, le rat est un des rares modèles de pathologie du système glymphatique dans lequel l'hyperémie est altérée.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur est adaptée à ce projet, évaluant l'état général de l'animal et la perte de poids. Des antalgiques sont prévus tout au long de ce projet, et une douleur trop élevée entraînera l'euthanasie de l'animal.

Afin d'analyser le rôle des principaux types de cellules du cerveau participant à l'hyperémie fonctionnelle, 10 modèles de souris transgéniques seront utilisées par an, à raison de 32 souris par modèle et 32 souris contrôles soit 352 souris chaque année. Pour les 5 ans du projet, le nombre de rongeur s'élève à 1760 souris. Et un modèle de rats, à raison de 10 rats par an, soit 50 rats pour les 5 ans.

L'observation de l'activité cérébrale sera menée - soit de manière aigüe au cours de la pose de la fenêtre d'observation, - soit dans un deuxième temps les animaux seront ré-anesthésiés plus tard après la pose d'une fenêtre transparente, - soit avec un animal éveillé et entraîné.

A long terme ce projet permettra

- 1) de comprendre les mécanismes physiologiques régulant le flux sanguin cérébral,
  - 2) de comprendre la nature et les limites des signaux utilisés en imagerie fonctionnelle de type IRM chez l'homme,
  - 3) de déterminer les bases physiopathologiques de certaines pathologies telles l'ischémie et la maladie des petits vaisseaux. qui rentrent en jeu dans tous les types de maladies neuro-vasculaire et ainsi améliorer les futurs traitements.
- Ces résultats contribueront à mieux comprendre les limites de l'imagerie humaine.

**9068** L'activité physique (AP) est aujourd'hui reconnue comme ayant de nombreux bénéfices contre le cancer et est de plus en plus intégrée dans le suivi des patients. Des études épidémiologiques ont récemment montré que la pratique d'une AP chez les hommes atteints d'un cancer de la prostate (CaP) était associée à une amélioration de leur espérance de vie. De plus, notre laboratoire a montré que dans un modèle de souris, l'AP pouvait améliorer l'efficacité de la radiothérapie (RT) grâce à une infiltration des cellules natural killer et une plus grande apoptose des cellules tumorales. Les microARNs (miARNs) sont de plus en plus étudiés pour leur implication dans le développement de CaP agressifs, mais également pour leur rôle dans la régulation des processus radiobiologiques et la réponse moléculaire de l'AP.

Nous faisons l'hypothèse que l'AP module l'expression d'un sous-ensemble de miARNs impliqués dans la radiorésistance des cellules CaP et par conséquent augmente la durée dont la tumeur a besoin pour retourner à son volume avant traitement (Tumor Growth Delay - TGD). Cette étude a donc pour but de comparer le profil de miARNs de tumeurs prostatiques qui rechutent, et traitées avec de la RT seule ou en combinaison avec de l'AP.

Ce projet de recherche implique 120 animaux et a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R. Ainsi, les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour s'assurer que les conditions de bien-être sont respectées, et par la mise en place de mesures visant à réduire la douleur des animaux pendant les procédures expérimentales (comme l'utilisation d'anesthésiant, d'analgésiant, et de tapis chauffant) (Raffinement). Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure (Réduction). Ce modèle expérimental in vivo est nécessaire pour comprendre les changements moléculaires induit par la combinaison de l'AP et de la RT, ce qui ne peut être remplacé par un modèle in vitro (Remplacement).

**9069** La recherche en neurosciences vise à approfondir les connaissances dans l'étude du cerveau et des pathologies associées. Le fonctionnement du cerveau repose sur la transmission d'informations électriques et chimiques entre les différents types de cellules qui le constituent (neurones, cellules gliales). La compréhension de cette communication chimique est un objectif essentiel en neurosciences. Le système cholinergique est l'un des principaux systèmes neuro-modulateurs participant aux processus attentionnels, à l'apprentissage et à la mémoire. L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur libéré au niveau des synapses des neurones « cholinergiques ». On suppose que, physiologiquement, les modifications de sa concentration ont un rôle fondamental dans ces processus cognitifs. Afin de pouvoir mesurer la concentration d'ACh dans le cerveau, le développement d'outils pour l'identification et le dosage de la choline, un sous-produit de l'ACh, est nécessaire. En effet, l'ACh est très vite dégradée en choline suite à sa libération in vivo. La mesure de la concentration de choline reflète donc la mesure de la concentration de l'ACh. Les biocapteurs implantables sont des outils permettant la mesure des concentrations de neurotransmetteurs, en temps réel, dans un tissu d'intérêt. Un biocapteur à choline a été développé. Il est d'ores et déjà capable de détecter des variations de concentrations de choline in vitro. L'objectif du projet est de valider l'utilisation de ce biocapteur électrochimique permettant de détecter la choline in vivo afin d'évaluer les variations de la concentration cérébrale d'ACh. Dans ce projet, des biocapteurs mesurant la choline seront introduits dans le cortex de souris transgéniques exprimant le channel rhodopsine (Chr2), une protéine permettant une libération spécifique d'ACh. Ce projet utilisera un

total de 40 souris sur cinq ans. L'ensemble des expérimentations décrites dans ce projet sera effectuée sur des animaux anesthésiés sans réveil. Chaque souris sera pesée puis anesthésiée à l'isoflurane. Avant tout acte chirurgical, une injection d'analgésique ainsi qu'une injection sous cutanée d'anesthésique local seront réalisées au niveau du scalp. Cette étude permettra de valider le bon fonctionnement du capteur à choline qui sera un outil pertinent, utilisable dans des études concernant l'apprentissage et la mémoire ; la description des mécanismes de neurotransmission mis en œuvre lors des troubles affectant la mémoire relevant de la santé humaine.

Conformité avec la règle des 3R :

Remplacement. L'utilisation du modèle animal apparaît incontournable car l'analyse du milieu interstitiel du cerveau s'effectue nécessairement in vivo. La souris est le modèle le plus adaptée pour cette étude car des souris transgéniques, permettant une libération spécifique d'ACh, existent.

Réduction. Notre projet est une étude préliminaire sur un nombre réduit d'animaux, destinée à déterminer l'effectif minimum requis pour nos futures études avec cet outil. L'expérience sera arrêtée dès l'observation de l'effet attendu pour n'utiliser que l'effectif nécessaire à la validation statistique.

Raffinement. Les souris seront hébergées par groupes de 3 à 5 animaux dans des cages présentant des éléments d'enrichissement (cachettes, tuyaux, roue d'activité, bois à grignoter...) dans notre animalerie agréée avec boisson ad libitum. Chaque souris sera pesée puis anesthésiée à l'isoflurane. La profondeur d'anesthésie sera évaluée et ajustée régulièrement afin d'effectuer nos mesures chez l'animal anesthésié de manière profonde et stable. La température corporelle de l'animal sera maintenue à 37°C par une couverture chauffante thermostatée. Un oxymètre de pouls sera déposé sur la patte de l'animal afin de monitorer l'état physiologique de l'animal (fréquence cardiaque, fréquence respiratoire et saturation en oxygène). En complément de l'anesthésie à l'isoflurane, une injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine) et d'anesthésique local (lidocaïne + ropivacaïne) sera réalisée avant tout acte chirurgical, au niveau du scalp, pour obtenir un effet anesthésique supplémentaire afin de minimiser la douleur liée à la chirurgie. Ce modèle de souris transgéniques est un modèle de choix qui nous permettra de valider notre outil tout en occasionnant le moins de souffrance et dommage à l'animal. En effet, l'utilisation d'une fibre optique déposée sur le cortex permettra d'induire une libération d'ACh sans avoir la nécessité de recourir à une stimulation électrique ce qui sera moins dommageable pour l'animal.

**9070** Nous nous intéressons à la sclérodémie systémique (ScS), une maladie auto-immune rare (9/100000 habitants) et au pronostic vital sombre dans les formes sévères. Elle associe une vasculopathie sévère (atteinte des cellules endothéliales des petits vaisseaux), des anomalies immunologiques (présence d'auto-anticorps et de cellules immunes auto-réactives) et une fibrose touchant la peau et les organes internes. A ce jour, il n'existe aucune thérapeutique efficace contre la fibrose qui est responsable d'une altération profonde de la qualité de vie des patients et qui grève leur espérance de vie, notamment quand la fibrose touche les organes vitaux comme les poumons par exemple.

Le rationnel de cette étude repose sur :

-l'observation clinique de l'amélioration spectaculaire d'une fibrose évoluée chez un patient sclérodémique, après traitement par un inhibiteur de la topoisomérase-1 (irinotecan) dans le cadre d'un cancer du rectum. Dès la deuxième perfusion de chimiothérapie, le patient ressentait une amélioration très forte de son état cutané avec une diminution de l'épaisseur de la peau et de son induration et un gain de souplesse cutané lui permettant d'améliorer significativement sa qualité de vie.

-la réalisation d'une étude in vitro qui montrait qu'un des trois produits de chimiothérapie qu'il avait reçu, l'Irinotecan, diminuait de façon importante la production de collagène par les fibroblastes et donc potentiellement la fibrose.

Ces observations ont fait l'objet d'un dépôt de brevet sur l'utilisation de l'irinotecan à visée anti-fibrotique au cours de la sclérodémie.

Il n'y a pas de méthode alternative dans la mesure où seul un modèle murin nous permettrait d'apporter la preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de l'Irinotecan à des fins anti-fibrotique chez les patients sclérodémiques en préventif et en curatif. L'intérêt du modèle animal choisi est qu'il permet l'induction d'une fibrose cutanée comparable à celle observée chez les patients sclérodémiques.

L'objectif de cette étude est donc de montrer dans un modèle animal de sclérodémie l'effet de l'Irinotecan sur :

- la limitation/la prévention de l'apparition de la fibrose lorsque celle-ci est en cours d'installation (= modèle préventif)

- la réversion de la fibrose lorsque cette dernière est déjà installée (=modèle curatif).

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences, 150 souris BALB/c sur une période d'un an. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse. Pour ce faire lors de chaque procédure entraînant une douleur estimée supérieure à celle d'une piqûre, les animaux seront anesthésiés.

**9071** Nous avons montré le potentiel thérapeutique des Tregs CD8+CD45RClow humains en transplantation dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD = graft versus host disease) chez la souris NSG. En effet, l'injection de Tregs CD8+ a permis de contrôler partiellement la réponse immune xénogénique des PBMCs humains contre la souris. Afin d'améliorer l'efficacité des Tregs en thérapie cellulaire, nous leur avons conféré une spécificité contre la molécule HLA-A2, source d'incompatibilité fréquente entre donneur et receveur, via un CAR (chimeric antigen receptor). L'objectif est maintenant d'évaluer le potentiel des CAR Tregs dans le contrôle de la GVHD lors d'une greffe de moelle osseuse.

Des souris NSG ont été génétiquement modifiées pour exprimer la molécule HLA-A2 humaine. L'injection de PBMCs humains chez ces souris entraînera une GVHD par reconnaissance du HLA-A2 humain exprimé par les cellules de la souris par les PBMCs. Cette réaction se caractérise par une perte progressive de 20% (point limite) du poids de la souris en environ 14 jours. L'objectif est d'utiliser ce modèle afin d'évaluer si la co-injection de CARTregs spécifiques du HLA-A2 permet de protéger la souris de la GVHD.

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

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité thérapeutique de ces cellules régulatrices dans un modèle vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites «humanisées ».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie, description des tests statistiques utilisés détaillée ci-après). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total maximum d'animaux est de 70.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GVH et/ou du rejet de greffe et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les cellules régulatrices et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des CAR Tregs CD8+CD45RClow sur les réponses immunes intervenant dans des contextes d'allogreffe de moelle osseuse, aideront à déterminer le nombre de cellules à administrer chez un patient pour le traiter, et permettront de mieux comprendre leurs mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. Il n'existe actuellement pas de traitement efficace pour contrôler la GVHD chez les patients transplantés moelle osseuse. Cette étude est appuyée par 2 brevets quant à l'utilisation des Tregs en thérapie cellulaire dans le domaine de la

transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies autoimmunes. La validation de ces cellules dans ce modèle préclinique de souris humanisée est une étape indispensable avant les tests cliniques.

**9072** La souris MDX (X-linked muscular dystrophy) est un modèle spontané de la myopathie de Duchenne, myopathie héréditaire et fatale due à l'absence de dystrophine. Un médicament administré dans l'eau de boisson permet de restaurer la fonction musculaire et la mobilité. Dans ce projet, nous évaluerons l'influence de ce traitement sur la fonction respiratoire. Pour ce faire des souris MDX mâles âgées de 12 semaines seront traitées pendant 3 mois et suivies pour leur fonction respiratoire par plethysmographie. Des souris MDX non traitées et des souris C57 black 10 traitées seront utilisées comme contrôles. Ce projet d'1 an sera effectué sur 36 souris. Cette étude respectera la règle des 3R :

- Remplacer : aucune stratégie ne peut être mise en place à part les animaux pour voir l'effet des médicaments sur la fonction respiratoire.

- Réduire : 12 souris/ groupe : minimum d'animaux pour avoir des résultats statistiquement interprétables

- Raffiner : - Utilisateurs expérimentés, hébergement adéquate (cycle jours nuit 12h, portoirs ventilés, 3 souris/cages, environnement enrichi avec cellulose dans les cages), pas d'utilisation d'anesthésique pour la procédure de plethysmographie car aucune souffrance n'est attendue. Utilisation de tapis chauffant et d'anesthésique pour la procédure de Flexivent (cf. procédure).

**9073** Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur des circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les axones et les dendrites acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Alors que les axones sont envoyés vers leurs cibles spécifiques, la formation d'une arborisation dendritique de plus en plus complexe autour du neurone permet la croissance des épines dendritiques qui établissent des contacts grâce à des jonctions intercellulaires spécialisées : les synapses.

Il est maintenant connu que les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) contrôlent la division asymétrique des cellules, le guidage axonal et la formation des synapses. Vangl2 est la protéine majeure de la PCP exprimée dans le cerveau des mammifères. Nous avons récemment constaté que cette protéine s'accumule dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Nous soumettons ici l'hypothèse que Vangl2 contrôle le développement des circuits de neurones de l'hippocampe au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au remodelage synaptique à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Réduire : Pour ce projet nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques différentes et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 240 souris sur 5 ans. Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour plusieurs tests et évaluations comportementales après chirurgie. Néanmoins pour garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous avons évalué par une étude statistique qu'un nombre minimum de 15 animaux par groupe génotype est nécessaire pour l'étude comportementale.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage enrichie avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. De plus concernant la procédure de chirurgie, une analgésie préalable, le mode d'anesthésie (gazeuse + locale) ainsi que le suivi-post opératoire permettent de réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.



**9074** Les lésions anopérinéales (LAP) de la Maladie de Crohn (LAPMC) sont fréquentes et graves. On distingue les LAP primaires (ulcérations), des secondaires (abcès, fistules). Les LAP secondaires ont un impact important sur la qualité de vie des patients, car douloureuses, invalidantes, souvent récidivantes et nécessitent le recours la chirurgie dans la majorité des cas (évacuation des abcès, drainage des fistules). La fréquence des récives et le caractère itératif de cette prise en charge font toute la gravité des LAPMC : le patient est exposé à long terme au risque de destruction du sphincter anal, d'incontinence, et parfois de stomie définitive.

Les recommandations actuelles concernant les LAP secondaires, source de suppuration périnéale, imposent le plus souvent une chirurgie en urgence, non délétère pour l'appareil sphinctérien, associé à une antibiothérapie.

Après drainage chirurgical efficace par séton, des traitements ayant pour objectif la fermeture des trajets fistuleux (Plug, encollage, lambeau d'avancement muqueux rectal etc.) peuvent être discutés. Ces traitements chirurgicaux sont d'autant plus efficaces qu'ils sont réalisés sur une maladie quiescente ou contrôlée par les traitements immunosuppresseurs tels que l'Azathioprine et les anti-TNF alpha, dont le but est d'obtenir une cicatrisation muqueuse (« mucosal healing »).

Toutefois, la récive demeure fréquente à moyen terme (au moins 50% dans la plupart des séries), marquée par le caractère chronique des trajets fistuleux et dont la prise en charge répétée est à l'origine de la destruction sphinctérienne, aboutissant encore souvent à la confection d'une stomie définitive.

Aux vues des données actuelles dans la littérature, les modèles expérimentaux de lésions anopérinéales sont très rares, les effectifs dans les séries sont faibles, et la reproductibilité reste donc difficile à démontrer. Il n'existe à ce jour aucun modèle de fistule anale chez le petit animal (rat ou souris) reproduisant à la fois la présence d'une inflammation colorectale (spontanée ou induite) et de LAP. L'élaboration de ce type de modèle permettrait de mieux étudier la physiopathologie des lésions, de leur cicatrisation et la mise au point de traitements locaux adaptés pour les LAPMC.

L'objectif de notre travail est de développer un modèle expérimental chez le petit animal, spécifiquement chez la souris, fiable et reproductible, de fistule anale trans-sphinctérienne, validée histologiquement et morphologiquement.

À terme, l'intérêt majeur de ce modèle pour la recherche expérimentale sera :

1) d'analyser les mécanismes de cicatrisation des LAP, 2) à terme, de permettre l'évaluation préclinique, chez la souris, de nouveaux biomatériaux actifs, actuellement en cours d'élaboration, pour traiter les fistules anales crohniennes.

Dans un premier temps, il sera question de mettre au point le modèle de fistule anale chez 20 rats Sprague Dawley non transgéniques, en réalisant deux procédures chirurgicales.

Dans un second temps, nous appliquerons le meilleur procédé d'induction retenu de lésions anopérinéales chez la souris Wild Type, puis Wild Type soumise à des injections de TNBS afin d'induire une inflammation locale similaire à celle de la maladie de Crohn, et enfin chez la souris double KO pour l'IL10 Nox 1, lignée développant spontanément des lésions de colite, afin de valider le modèle en terme de fiabilité, reproductibilité. Un effectif de 10 souris par groupe a été estimé nécessaire pour la réalisation du projet; 5 souris WT constitueront le groupe contrôle. Un effectif de 35 souris au total sera donc nécessaire à la réalisation des expérimentations.

Afin de respecter au mieux la règle fondamentale dite des "3R" (WMS Russel, RI Burch, 1959, "Reduce, Refine, Replace"), les effectifs minimums d'animaux, sus-cités dans chaque groupe, et nécessaires à l'obtention de résultats exploitables ont été estimés à l'aide de calculs statistiques (non paramétriques, de Kruskal Wallis, permettant de comparer des groupes et sous-groupes de faibles effectifs) ; le rat est utilisé comme modèle en première intention afin de se familiariser aux procédures chirurgicales délicates, qui le seront d'autant plus chez la souris par la suite, compte tenu de la taille de l'animal ; il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation sur la souris, modèle bien connu de colite Crohn-like dans la littérature, constituant un point fondamental de ce projet (fistule anale sur fond d'inflammation rectale sous-jacente). Nous aurons la possibilité d'accès au partage de rats de même souche auprès d'autres équipes du laboratoire -notamment pour les rats contrôles, ne subissant aucune procédure chirurgicale et non sacrifiés mais bénéficiant d'une anesthésie générale pour l'étude morphologique (IRM) ; enfin, les procédures chirurgicales seront toutes réalisées sous

anesthésie générale et la douleur des animaux sera prévenue et/ou soignée par une analgésie adaptée.

**9075** Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches. Ces précurseurs musculaires doivent développer des interactions spécifiques avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle tout au long de la vie.

Notre projet vise à comprendre les rôles des cellules qui environnent les cellules souches musculaires et à identifier en quoi ces rôles sont altérés dans les pathologies musculaires. Ceci permettra l'établissement de nouvelles connaissances scientifiques, qui pourraient être utilisées dans la compréhension des pathologies du muscle squelettique. En effet, de nombreuses pathologies affectent le muscle, ainsi que le vieillissement ou un exercice physique trop intense.

Nos études utilisent de la culture cellulaire, à partir de cellules humaines, mais également de cellules murines, dont les modèles transgéniques permettent l'exploration du rôle de certains gènes. Ces expériences in vitro sont couplées à des expériences in vivo, nécessitant le recours aux animaux (souris). Si les interactions cellulaires peuvent être disséquées in vitro, il est indispensable de valider leur importance dans le remodelage tissulaire physiologique ou pathologique in vivo, à l'aide des modèles adéquats. C'est indispensable pour une approche physiologique intégrée et des essais à l'échelle préclinique d'activateurs/ inhibiteurs des voies moléculaires identifiées comme contrôlant ces interactions cellulaires.

Ce projet est divisé en 4 procédures et mobilisera 2515 souris, y compris les individus reproducteurs. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux, remplacement : l'ensemble de l'équipe travaillant sur des sujets proches, les animaux sont "partagés" par plusieurs expérimentateurs. De plus, des banques biologiques issues des expérimentations sont gérées de façon commune afin d'y recourir et limiter l'utilisation de nouveaux animaux. Elles permettent notamment les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses différentes. Autant que faire se peut, des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles. Les analyses statistiques précédentes de l'équipe permettent d'ajuster le nombre d'animaux requis au minimum. Les accouplements sont optimisés afin de produire le nombre nécessaire de souris. De plus, certains croisements engendrent des souris de génotype "inutile" (wild type) pour une lignée donnée : ces souris sont utilisées comme contrôles pour d'autres lignées, puisque la grande majorité de nos lignées ont le même fond génétique.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Enfin, le suivi de critères précis permettra de raffiner les protocoles et de mettre à mort rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable.

**9076** Il n'existe pas à ce jour de traitements efficaces contre les maladies neurodégénératives graves telles que la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, les ataxies spino-cérébelleuses (SCAs) et la sclérose amyotrophique latérale (SLA). Les thérapies géniques, qui consistent à administrer des gènes "correcteurs" aux patients, sont des solutions en cours de développement. Dans ce cadre, l'objectif de notre projet est d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration de vecteurs viraux (AAV), dont la fonction est de transporter et intégrer des gènes d'intérêt dans des parties distinctes du système nerveux (cerveau et moelle épinière).

L'administration des vecteurs AAV se fera par voie chirurgicale (dans le cerveau, par voie intraveineuse ou dans le liquide entourant la moelle épinière au niveau lombaire). Les vecteurs utilisés exprimeront des gènes rapporteurs ou thérapeutiques. Cette étude nous permettra de choisir la combinaison idéale d'administration (voie d'injection, sérotype de vecteur et dose à administrer).

Les modèles primates non-humains (PNH) sont aujourd'hui indispensables pour évaluer les difficultés de l'administration des volumes importants de vecteur et du ciblage des organes en particulier le cerveau et la moelle épinière. Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au

niveau des plans anatomiques et fonctionnels du système nerveux central et du point de vue immunitaire (tolérance immune semblable).

Tous les animaux utilisés seront nés et élevés en captivité dans des élevages reconnus et agréés. Le projet proposé limitera le nombre d'animaux au strict minimum nécessaire (31 primates), et veillera à leur bien être lors des procédures d'administration de vecteurs AAV et leur suivi. Des échelles cliniques quotidiennes, un appui nutritionnel adéquat et l'application de critères d'arrêt permettront de surveiller le bien-être des animaux utilisés.

Tous les vecteurs AAV utilisés seront caractérisés/validés in vitro. Leurs productions auront au préalable été testées chez le modèle rongeur avant l'administration chez le PNH.

Afin de réduire le nombre d'animaux de ce projet, nous utiliserons dans un premier temps un gène rapporteur fluorescent pour comparer les vecteurs suivant les voies d'administration. Une fois le vecteur optimal identifié pour chaque voie d'administration, nous utiliserons le vecteur porteur de notre gène d'intérêt pour évaluer sa distribution et son expression et comparer les divers modes d'administration afin de transduire au mieux les régions du système nerveux central impliqués respectivement dans Alzheimer, Huntington, l'ataxie spino-cérébelleuse et la sclérose latérale amyotrophique.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de neurochirurgiens (qui traiteront ensuite les patients par la voie ainsi mise au point), de vétérinaires spécialistes de la chirurgie et du bien-être des PNH et des chercheurs spécialistes de vecteurs AAV. Cela garantit la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie in vivo (IRM pré- et post-opératoire), renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

**9077** La vasorine (Vasn) est une protéine transmembranaire impliquée dans la signalisation du TGF- $\beta$ . Cette protéine pourrait être impliquée dans des syndromes néphrotiques rares ou acquis, des troubles osseux ou plus généralement dans les maladies cardiovasculaires. Initialement étudiée dans le développement, la vasorine est exprimée chez la souris adulte dans de nombreux tissus et notamment les artères, les os, les dents et les reins. La génération de souris knock-out (Ko) Vasn n'a fourni que peu d'informations sur les fonctions Vasn car les souris meurent à environ 21 jours. Il est donc indispensable de développer un modèle de souris Vasn Ko conditionnelle afin de comprendre le rôle de la vasorine en particulier sur la fonction et la structure vasculaire. Deux types de souris Vasn Ko conditionnelle seront développés. L'un des modèles permettant l'extinction de l'expression de la vasorine dans l'ensemble des tissus et l'autre modèle permettant uniquement l'extinction de l'expression de la vasorine au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires.

Une étude préliminaire sur l'utilisation du tamoxifène sera réalisée en testant l'effet dose du tamoxifène (2 doses) ainsi que l'effet temps de son action (2 temps) avec un effectif de 6 souris par groupe soit 24 souris pour valider les conditions de Ko conditionnel pour l'ensemble des tissus et 24 souris pour le Ko conditionnel pour les cellules musculaires lisses afin de déterminer les conditions optimum d'utilisation du tamoxifène permettant une extinction de l'expression de la vasorine.

Après validation des techniques d'utilisation du tamoxifène, le nombre d'animaux nécessaire à l'étude de la fonction et de la structure vasculaire pour le Ko conditionnel pour l'ensemble des tissus ou pour le Ko conditionnel pour les cellules musculaires lisses est de 54 animaux respectivement ce qui nous porte à un total de 156 animaux. Ce nombre total d'animaux est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux.

Les mesures prises en vue de respecter le principe des 3Rs sont les suivantes :

La vasorine ayant un rôle très complexe et étant exprimée dans de nombreux tissus les études in silico ne peuvent à l'heure actuelle répondre aux questions fondamentales et l'utilisation de modèles animaux reste indispensable. Notre choix s'est porté sur un modèle de souris car c'est le modèle le plus utilisé, le plus accessible et reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique pour la génération d'animaux Ko (remplacement).

Par ailleurs un grand nombre de paramètres histologiques et fonctionnels seront évalués sur les mêmes animaux et le nombre d'animaux par groupe est maintenu au minimum (réduction)

Toutes les précautions d'usage en terme d'anesthésie seront mises en œuvre afin de limiter la douleur des animaux. Un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

**9078** **Projet :** L'arthrose est la cause majeure de douleur et de handicap physique au niveau mondial. Elle touche plus de 50% des européens dans la seconde moitié de leur vie, mais peut aussi toucher des individus plus jeunes. Elle est caractérisée par une détérioration progressive du cartilage articulaire, des douleurs articulaires croissantes, une diminution de la mobilité et une altération importante de la qualité de vie. Les causes de cette pathologie peuvent être multiples : usure liée au vieillissement, origine traumatique, ou encore origine inflammatoire. Les traitements médicaux et pharmacologiques sont peu nombreux et principalement de nature palliative. Ils reposent sur le soulagement de la douleur. Il n'existe actuellement pas de traitement pharmacologique efficace pour prévenir ou freiner la progression de la maladie. Aux stades avancés de la pathologie, la seule issue demeure la mise en place d'une prothèse par chirurgie. Malgré l'efficacité de l'approche chirurgicale, elle présente des risques et des limites tels que les infections péri-prothétiques et la durée de vie limitée des prothèses.

A l'heure actuelle, les mécanismes physiopathologiques de l'arthrose sont encore peu connus et une meilleure connaissance des voies de signalisation mises en jeu permettrait de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet propose d'étudier un des processus décrit comme jouant un rôle majeur dans le développement de l'arthrose : la différenciation hypertrophique du chondrocyte. Ce processus est pathologique dans le cartilage articulaire mais, physiologiquement, il permet également la croissance du squelette jusqu'à la puberté.

La protéine adaptatrice ShcA (Src Homology and Collagen A) contrôle la différenciation hypertrophique du chondrocyte. En effet les souris déficientes en ShcA spécifiquement dans les chondrocytes présentent un phénotype de nanisme qui reflète une altération de la différenciation hypertrophique.

Ce projet vise donc à caractériser les mécanismes par lesquels ShcA contrôle la différenciation hypertrophique du chondrocyte et à déterminer si la délétion de ShcA dans le chondrocyte permet de réduire la formation de lésions d'arthrose. Il permettra une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'arthrose et également de savoir si ShcA pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle.

Nombre d'animaux :

Nous utiliserons 640 souris sur 5 ans au maximum.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du 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.

Nous mettons en culture des cellules prélevées sur ces souris 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 procédures invasives sont réalisées sous anesthésie/analgésie avant le stade d'apparition de la douleur et un suivi est réalisé régulièrement. 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, de maisonnettes en plastique et/ou de morceaux de bois.

**9079** Les pathologies de l'ovaire résultent de dysfonctionnement des gènes nécessaires à la formation de l'ovaire. La voie génétique de signalisation WNT est essentielle à différentes étapes du développement de cet organe. Il a été montré que le stock définitif de follicules ovariens est établi avant la puberté. Les follicules nourrissent les cellules reproductrices ou ovules et un stock anormalement faible de follicules conduit à l'insuffisance ovarienne précoce et à l'infertilité. Cette pathologie affecte 1 femme sur 1000 de moins de 30 ans. A l'heure actuelle, on connaît peu les

mécanismes qui permettent l'établissement du stock de follicules ovariens. Les gènes FOXL2 et Nobox sont importants pour l'établissement de ce stock et le gène Rspo2 est un des gènes principaux qu'ils régulent. Les mutations hétérozygotes de Rspo2 induisent la formation de kystes ovariens et les mutations homozygotes de ce gène résultent en une détresse respiratoire responsable de la mort des fœtus dans les heures suivant leur naissance. Cela empêche de déterminer le rôle de Rspo2 dans l'établissement du stock de follicules ovariens.

A l'heure actuelle, la morphogenèse de l'ovaire nécessite une étude dans un modèle animal car il n'existe pas de modèle *in vitro* recréant les conditions de formation de l'ovaire. Cela est dû en particulier à la variété de cellules qui sont impliquées dans la formation de cet organe. Nous avons débuté ce projet dans un souci de respecter la règle des 3R visant à remplacer les souris. Nous avons réalisé des cultures d'ovaire mais celles-ci induisent la dégénérescence des cellules due au manque d'échanges sanguins. Nous avons ensuite essayé des greffes d'ovaires de souris dans des œufs de poule pour fournir un milieu vascularisé, mais cela ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants, la cinétique de développement des deux espèces étant trop différente. Nous sommes donc obligés d'utiliser un modèle murin récapitulant la pathologie humaine. Nous prélèverons des ovaires de fœtus de souris déficientes pour Rspo2 avant leur mort et les grefferons chez des souris femelles immuno-réprimées, receveuses âgées de 2 à 4 mois afin d'étudier les anomalies du développement ovarien dues à l'ablation de Rspo2. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos analyses sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteindrons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations. Dans un but de raffinement du bien être des souris, nous administrerons des antalgiques en post-opératoire pour prévenir toute douleur. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 33 souris transgéniques et 60 souris receveuses soit un total de 93 souris. Ces résultats nous permettront de définir le rôle de Rspo2 dans la formation de l'ovaire et les pathologies comme les insuffisances ovariennes précoces.

**9080** L'étude de la fonction cardiovasculaire est un élément réglementaire, répondant aux textes ICHS7a et ICHS7b, incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Pour la fonction cardiovasculaire, les effets tensionnels et électro-cardiographiques doivent être caractérisés en portant une attention particulière à l'étude de la repolarisation ventriculaire car la prolongation de celle-ci est un facteur de risque majeur dans la survenue de troubles du rythme, comme les torsades de pointes (TdP). L'évaluation du risque arythmogène se fait très tôt dans le développement de candidats médicaments grâce à des modèles mathématiques, l'évaluation des effets sur les canaux à l'aide de cellules transfectées ou sur des cardiomyocytes humains issus de cellules pluripotentes. Mais ces méthodes ne permettent pas l'évaluation sur une cellule entière, mature et fonctionnelle contrairement à l'enregistrement de potentiel d'action issu de la fibre de Purkinje ou de muscle papillaire et d'électrocardiogramme de surface de cœur isolé. Ces études *in vitro*, conduites le plus souvent chez le lapin (fibres de Purkinje et cœur isolé) pour son analogie avec l'homme au niveau des canaux présents dans les cellules cardiaques permettent de ne sélectionner pour les études *in vivo* que les candidats médicaments ne présentant que peu de risques d'arythmies. Il est parfois nécessaire de poursuivre les investigations par l'évaluation du risques arythmogène sur des modèles de muscles papillaires chez le cobaye (pour l'évaluation de la fonction contractile ventriculaire) et/ou des modèles de cœur isolé chez le rat (évaluation des fonctions vasculaires dans le modèle de cœur isolé). Ces études, chez le cobaye et chez le rat, sont ponctuelles et répondent à une recherche mécanistique particulière. Les données internes du laboratoire portant sur plusieurs dizaines de molécules de références permettent de limiter le nombre de d'expériences (n=3 animaux) avec un même produit tout en testant plusieurs concentrations (entre 4 et 5 concentrations maximum pour un même prélèvement). Les études réalisées sont encadrées par des recommandations internes, nationales et internationales, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et à la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, les prélèvements sont réalisés en respectant les recommandations éthiques spécifiques à chaque espèce relatives aux modalités d'expérimentation et visant à prévenir toute douleur ou détresse de

l'animal. Le nombre d'animaux utilisé sur 5 ans se décompose comme suit : 2800 lapins, 100 rats, 100 cobayes.

**9081** Le développement et le fonctionnement du système nerveux dépendent du maintien de l'intégrité du génome. D'une part, de nombreux troubles neurologiques humains d'origine génétique résultent d'une signalisation et d'une réparation défectueuse de l'ADN (syndrome de Cockayne, ataxie télangiectasie...) d'autre part, le cerveau humain peut être exposé à de nombreux agents endommageant l'ADN tels que les polluants et accidentellement à des rayonnements ionisants (utilisations médicales pour le diagnostic ou les traitements de tumeurs, accidents nucléaires). Il est établi que les rayonnements ionisants peuvent induire de nombreuses pathologies cérébrales telles que la microcéphalie, les troubles cognitifs, la démence et les cancers.

Le but de notre étude sera d'étudier les conséquences de la déficience de la protéine XLF qui est connue pour être impliquée spécifiquement dans la réparation de l'ADN dans les cellules souches neurales et leur environnement au cours de la neurogenèse embryonnaire et adulte. Parallèlement, nous souhaitons étudier l'impact de sa déficience dans les cellules souches neurales dans la réponse à l'irradiation (migration, différenciation et mort cellulaire).

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle animal. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour qui pourrait modéliser la complexité du cerveau et l'ensemble des processus physiologiques ayant lieu au cours du développement embryonnaire du cerveau. Il est en de même pour le cerveau adulte. Le modèle rongeur a été retenu car la neurogenèse chez le rongeur présente de nombreuses similitudes avec celles de l'ensemble des mammifères. Ce modèle nous permet également d'obtenir rapidement les différents génotypes nécessaires à l'étude.

Les modèles de rongeurs qui ont confirmé l'importance des voies multiples de réparation ADN pour le développement du cerveau reposent sur la suppression dans toutes les cellules d'un gène codant l'une des protéines impliquées dans ces voies de réparation. Ainsi, les conséquences de l'absence de ces gènes ne reflètent pas spécifiquement leur importance et leur rôle au sein des cellules souches neurales.

Nous nous proposons de développer un modèle transgénique différent pour étudier le rôle de cette protéine d'intérêt. Dans celui-ci, XLF est inactivée spécifiquement au niveau des cellules souches neurales de manière partielle ou totalement. La neurogenèse de ces souris sera étudiée en condition normale de développement ou après irradiation. Les conséquences de la suppression de la protéine de réparation ciblée seront suivies par la mise en place de protocoles utilisés en routine au laboratoire comprenant des analyses des tissus et des différentes populations cellulaires.

Le nombre minimum nécessaire d'animaux pour que les résultats de cette étude puissent être analysés statistiquement avec fiabilité a été déterminé. Il est de (900 souris adultes (450 femelles gestantes et 450 souris adultes) et 2700 embryons pour toute la durée de l'étude (5 ans).

Les animaux sont nés et élevés dans des élevages agréés. L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes et l'apparition d'une souffrance éventuelle. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant du coton de nidification et des tunnels. L'application de critères d'arrêts des animaux hébergés en groupe nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

**9082** Ce projet s'inscrit dans l'étude des changements métaboliques qui sont observés chez des sujets obèses ou diabétiques qui subissent une chirurgie bariatrique. Cette chirurgie est l'une des approches les plus utilisées pour lutter contre les formes sévères d'obésité chez l'homme. Il a été observé chez ces patients, une amélioration rapide et significative de paramètres métaboliques comme une amélioration de la glycémie (lorsqu'ils sont diabétiques) avant toute perte de poids. Il existe sûrement des signaux (nerveux ou hormonaux) qui sont modifiés de façon précoce lors de cette chirurgie.

Nos modèles de rats comprenant 210 rats Goto-Kakizaki génétiquement diabétiques et 30 rats Wistar, chez lesquels cette chirurgie bariatrique sera réalisée ainsi qu'une dénervation sélective hépatique dans le but d'identifier ces mécanismes.

En effet de façon à adapter l'équilibre énergétique, le système nerveux central (SNC) reçoit de multiples signaux périphériques qui transmettent des informations sur le statut nutritionnel et métabolique. Certaines de ces informations parviennent au SNC par l'intermédiaire de signaux hormonaux, principalement d'hormones gastro-intestinales (ghréline, GLP1), d'hormones pancréatiques (insuline, glucagon) ou d'hormones du tissu adipeux (leptine, adiponectine, résistine), de nutriments ou de métabolites (glucose, acides gras circulants, acides aminés). D'autres informations sont véhiculées par la voie du système nerveux autonome (SNA), en effet il existe une communication bidirectionnelle entre le SNC et le SNA, la voie afférente est le chemin qu'utilise l'influx nerveux autonome (SNA) pour se rendre au système nerveux central (SNC), la voie efférente est le chemin qu'utilise l'influx nerveux central (SNC) pour se rendre au système nerveux autonome.

Le système nerveux autonome (SNA) est responsable des fonctions automatiques de l'organisme (digestion, rythme cardiaque, transpiration...), il s'occupe de régler le fonctionnement des organes internes, des glandes, ainsi que des vaisseaux sanguins. Le SNA comprend deux systèmes : les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques. Ces deux systèmes contrôlent l'activité des organes internes par des actions opposées, le système sympathique prépare l'organisme à une réponse d'urgence, il est associé à l'activité de deux neurotransmetteurs : la noradrénaline et l'adrénaline, il inhibe la sécrétion d'insuline, alors que le système parasympathique amène un ralentissement général des fonctions de l'organisme, il est associé au neurotransmetteur acétylcholine et il stimule la sécrétion d'insuline.

La gastrectomie verticale (Sleeve) consiste en la résection des 2/3 de l'estomac, cette chirurgie bariatrique enlève la partie de l'estomac où est sécrétée l'hormone stimulant l'appétit (la ghréline). Cette technique améliore rapidement le métabolisme glucidique chez les diabétiques de type 2, avec une normalisation de la glycémie, une diminution de l'insulino-résistance, une régression de la stéatose hépatique.

Pour comprendre si ces modifications, suites à cette chirurgie bariatrique, passent par l'action du système nerveux autonome, nous étudierons la connexion neuronale cerveau-foie, en effet le foie est avant tout un régulateur rapide et efficace de la glycémie. Le foie assure le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines tout en sécrétant la bile, élément essentiel à la digestion. C'est pour cela que nous procéderons à des dénervations spécifiques du foie, celui-ci est innervé par des nerfs sympathiques (HSx) et parasympathiques (HPx). Nous étudierons dans nos modèles de chirurgies (gastrectomie et/ou dénervation sélective) les changements des sécrétions hormonales (hépatiques, gastro-intestinales, pancréatiques, tissu adipeux).

Pour ce projet, l'approche chirurgicale ne peut être substituée par une autre méthode ou technique. Dans un souci de raffinement nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement, en adéquation avec la règle des 3 R : Réduire pour diminuer le nombre d'animaux utilisés, Remplacer quand il est possible de travailler sur des cellules ou des tissus, Raffiner pour réduire, supprimer ou soulager la douleur ou la détresse des animaux.

**9083** Au cours de la tumorigenèse, la carence nutritionnelle des cellules tumorales les contraint à modifier leur métabolisme pour survivre.

Cette reprogrammation métabolique caractéristique des cellules cancéreuses, va notamment concerner une voie permettant la production des sucres nécessaires à la fonctionnalité des protéines. En condition de stress métabolique, le flux de cette voie augmente et il exerce le plus souvent des effets pro-survie. Un des axes de recherche du laboratoire vise à caractériser les mécanismes moléculaires qui contrôlent la stimulation de la voie pour proposer à terme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Il a démontré que l'activation d'une kinase par le stress nutritionnel, stimule la voie de synthèse de ces sucres et donc ses effets pro-survie notamment via l'induction de l'expression d'une seconde kinase. Ces résultats ont été obtenus dans des modèles de cellules pulmonaires.

Ce projet vise à confirmer in vivo les rôles de ces deux protéines kinases dans la stimulation de la voie de synthèse des sucres au cours de la progression tumorale en permettant la génération des lignées invalidées pour les deux gènes permettant l'expression de ces kinases et en les croisant avec un modèle souris développant spontanément des tumeurs pulmonaires.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée : 1-Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. 2-Raffinement : une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. 3- Remplacement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Après l'obtention de nos résultats en modèles cellulaires, seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier l'effet de ces kinases sur la croissance de cellules tumorales.

Pour ce projet, nous estimons avoir besoin de 96 souris sur une durée de 5 ans.

- 9084** Le GABA (acide gamma-aminobutyrique) étant le principal neurotransmetteur inhibiteur joue un rôle important dans la physiologie des mammifères. Les récepteurs du GABA sont la cible de plusieurs molécules pharmacologiques, incluant les benzodiazépines, les barbituriques, les alcools, les anesthésiques généraux volatils. Le but de ce projet consiste à évaluer la modulation du GABA in vivo et sa relation avec un mécanisme moléculaire nommé autophagie. Cette étude peut être conduite seulement in vivo car la modulation du récepteur du GABA implique et/ou affecte des voies métaboliques et/ou des régulations physiopathologiques qui ne peuvent pas être évalués in vitro. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique l'utilisation (au maximum) de souris immunocompétentes normales (n. 750) et transgéniques (n. 1710). Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.
- 9085** Dans le cadre de l'étude du rôle des récepteurs aux oxystéroïdes (LXRs) dans le processus de dissémination métastatique, nous sommes amenés à comprendre in vivo le rôle des androgènes dans le processus de carcinogenèse prostatique. Ainsi, nous souhaitons réaliser une exploration phénotypique en particulier sur le phénomène de dissémination métastatique. En effet, l'un des enjeux majeurs du traitement des cancers de la prostate métastatique est de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la résistance à la privation androgénique (ADT – Androgen Deprivation Therapy). Il est donc nécessaire de mettre en place des modèles murins qui miment cet échappement thérapeutique et qui développe un cancer résistant à l'absence d'androgènes (CRPC – Castrated Resistant Prostate Cancer). Ainsi, ce projet propose de réaliser une castration sur des animaux modèles de carcinogenèse prostatique *Ptenpc<sup>-/-</sup>* et *Ptenpc<sup>-/-</sup>Lxrab<sup>-/-</sup>*. Ce projet permettra donc de mieux comprendre le rôle des LXRs lors de la mise en place de l'androgéno-indépendance de la tumeur. Pour cela, un protocole de comportant ces deux lignées, ainsi que des souris de même fratrie (non transgéniques), qui serviront de témoins, sera mis en place. Ce protocole sera conduit sur une cohorte de 40 animaux divisés en 4 lots correspondant aux lignées transgéniques et à leurs témoins respectifs. Les animaux seront castrés par chirurgie sous anesthésie et analgésiques. Les différents tissus nécessaires aux analyses moléculaires et histologiques seront prélevés après euthanasie de l'animal, 1 mois après la castration, permettant l'émergence d'un carcinome résistant à l'absence d'androgènes.
- 9086** Suite à des études chez la souris, confirmées chez l'homme, il est aujourd'hui clairement admis, que l'inflammation chronique et particulièrement la réaction des lymphocytes contre les bactéries qui composent la flore commensale de l'organisme (microbiote) favorisent le développement de cancers notamment intestinaux. Parmi les lymphocytes présents au sein des muqueuses intestinales, les lymphocytes T helper 17 (Th17) sont très représentés, et particulièrement impliqués dans les réponses contre le microbiote. Ainsi, améliorer nos connaissances des mécanismes qui contrôlent la



réaction de ces lymphocytes contre le microbiote semble essentiel à la compréhension et donc à l'établissement de traitement anti-cancéreux. Parmi les molécules qui contrôlent les Th17, le Transforming Growth Factor (TGF-beta) apparaît depuis quelques années comme une protéine majeure. Nos observations chez la souris ont révélé qu'en l'absence de contrôle des lymphocytes par le TGF-beta, les animaux développent spontanément des cancers ou des transformations cellulaires dans les régions riches en microbiote que sont l'intestin grêle et le colon. L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle du TGF-beta dans le contrôle de la réponse des Th17 contre le microbiote et les conséquences directes sur le développement de cancers intestinaux. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant les premiers mécanismes responsables du cancer suite à l'activation des lymphocytes par le microbiote, qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers l'utilisation d'antibiotiques ciblés comme agents thérapeutiques d'une inflammation à l'origine de cancers. La réponse aux questions scientifiques posées implique un modèle murin du fait de l'interaction de trois systèmes complexes que sont le microbiote, le système immunitaire et l'organe cible. Seul des études chez la souris, pour qui les réactifs sont adaptés, et la caractérisation de microbiote est bien décrite, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques. Des expériences telles que des transferts de cellules immunitaires, de microbiote ou encore l'analyse de l'effet d'un antibiotique sur la génération de tumeurs seront réalisées. Pour ne pas causer de douleur ni de stress aux animaux ceux ci seront manipulés sous anesthésie générale. Une attention particulière sera aussi apportée à leur réveil, avec l'utilisation de tapis chauffant, pour que le réveil ait lieu dans les meilleures conditions possibles. Pour chaque expérience une observation quotidienne des animaux par les expérimentateurs sera effectuée, avec suivi de points limites précoces et prédictifs, ainsi que l'utilisation de médicaments anti-douleur afin d'éviter aux animaux de souffrir. Dans le but de réduire le nombre d'animaux inclus dans le projet, les expériences in vitro seront privilégiées par rapport aux expériences in vivo chaque fois que cela sera possible. Pour ce projet, 390 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans.

**9087** Les allergies alimentaires, touchant presque 20% de la population générale sein des pays industrialisés, peuvent être mortelles chez les enfants. D'autre part, l'exposition humaine à des polluants environnementaux a attiré l'attention des autorités sanitaires ces dernières années. Une attention particulière a été portée sur le bisphénol A (BPA) compte tenu de sa capacité, chez l'animal, à perturber différentes fonctions physiologiques à des niveaux environnementaux semblables pour l'homme. Les liens entre l'exposition au BPA et le développement des allergies ou de l'asthme étudiés in vitro et in vivo ainsi qu'à travers des études de cohortes humaines, indiquent que des changements immunologiques délétères peuvent survenir, y compris une propension accrue à développer une allergie suite à une exposition à ce produit chimique. Néanmoins, les mécanismes par lesquels le BPA altère la réponse immune au cours de l'allergie restent des éléments de compréhension cruciaux non élucidés. Le projet BPALLERGIC propose d'étudier l'influence d'une exposition à de faibles doses de BPA, pendant la période périnatale, sur la sensibilisation et la sévérité de la réaction allergique alimentaire, dans un modèle préclinique d'allergie. Ainsi, l'effet potentiellement adjuvant du BPA dans l'allergie alimentaire sera évalué pendant la période correspondant au développement du système immunitaire en fonction de la dose d'exposition. Ces données pourront alors servir de biomarqueurs et ainsi permettre le développement de moyen de prévention. De nombreuses études ont souligné un rôle important du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AHR) dans l'immunomodulation. Les AHR lient également des composés dérivés des plastiques dont le BPA. Ainsi, les mécanismes d'action du BPA seront explorés grâce à l'utilisation de souris déficientes pour ce récepteur (AHR<sup>-/-</sup>) de façon ubiquitaire ou conditionnelle. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de 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 systèmes in vitro ou in silico. Ainsi, ces questions pourront être traitées par un nombre limité d'expériences et d'animaux. Seuls les chercheurs expérimentés et qualifiés effectueront les expérimentations animales. Ces exigences visent à s'assurer que les procédures nécessaires à l'élevage et à l'expérimentation seront exécutées efficacement, avec les soins appropriés afin de minimiser la souffrance des animaux. Le nombre de

souris nécessaire sera au maximum de 144 souris gestantes (48WT + 48 AHR-/- + 48AHRLoxp-VilinCre) afin d'obtenir 576 souriceaux pour la totalité du projet. Néanmoins, ce nombre sera réduit si le nombre de souriceaux est atteint avec moins de souris gestantes. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

3R :

- Réduire : Nombre d'animaux réduit au minimum tout en étant statistiquement relevant.
- Remplacer : Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico.
- Raffinement : Hébergement adéquat, utilisateurs expérimentés, utilisation d'anesthésiques, tapis chauffant

**9088** A la suite d'une blessure cutanée (coupure ou brûlure), le processus de cicatrisation commence ; il se déroule en trois étapes :

- Une phase vasculaire et inflammatoire,
- Une phase de réparation
- Une phase de maturation (remodelage)

Certaines blessures guérissent facilement alors que d'autres vont prendre plus de temps, surtout si elles sont graves ou si la personne présente un état physiologique fragilisé ou pathologique, comme le diabète.

Les personnes diabétiques peuvent alors être sujettes aux plaies chroniques ; une plaie chronique étant une plaie dont le délai de cicatrisation est allongé, 4 à 6 semaines d'évolution, selon son étiologie.

Le projet est d'étudier la cicatrisation de différents types de plaies cutanées. Les plaies seront induites par une pression forte (modèle escarre), une excision (coupure) ou une brûlure en fonction du sexe et de l'état pathologique des souris (saines versus diabétiques).

Dans un premier temps, le but sera d'évaluer le délai de cicatrisation de chacune de ces plaies. Dans un second temps, le but sera d'étudier l'effet bénéfique de différents traitements locaux sur la cicatrisation de ces plaies. Les différents traitements envisagés sont :

- un traitement purement mécanique grâce à des électrodes de vibrations,
- un traitement à l'aide d'une crème cicatrisante,
- un traitement par injection d'exosomes (petites vésicules intracellulaires).

La cicatrisation repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Lors des inductions de plaie, les souris seront anesthésiées à l'isoflurane ou par un mélange xylazine/kétamine (selon le type de plaie). A la suite de plaies sévères, les souris bénéficieront d'un traitement antalgique sur plusieurs jours.

Pour le suivi de la cicatrisation nécessitant une immobilisation des souris et afin de limiter leur stress, celles-ci seront maintenues sous une légère anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué au minimum 3 fois par semaine. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal.

En cas d'atteinte d'un point limite en cours d'expérimentation, la souris sera mise à mort.

Ce projet concernera 2052 souris au maximum.

**9089** Les cancers du poumon sont les cancers les plus mortels. En France, ce cancer entraîne environ 27000 décès chaque année. Certaines anomalies génétiques ont été identifiées comme celles du gène RAS et sont probablement associées à une plus grande agressivité tumorale et une résistance à la chimiothérapie. Il est nécessaire de découvrir des traitements efficaces pour ce groupe de cancers du poumon.

Nous proposons d'utiliser un modèle animal murin original de cancer pulmonaire muté pour RAS (K-rasLA1) afin de mieux comprendre le rôle de ce gène dans la progression tumorale et de découvrir des traitements personnalisés de cette anomalie génétique. Lors d'un travail préliminaire sur ce modèle, il a été montré que les lésions tumorales des animaux étaient le siège d'une réaction inflammatoire et d'une réaction angiogénique croissante lors de la progression maligne. Notre objectif est de réaliser une banque de tissus tumoraux et sains pulmonaires et de liquides biologiques de ce modèle K-rasLA1 et des souris sauvages de même fonds génétique afin d'étudier les mécanismes de la progression tumorale, et plus particulièrement la réaction inflammatoire et angiogénique. Cette stratégie nous semble pertinente à la mise en évidence in vitro de nouveaux marqueurs et nouvelles molécules thérapeutiques, et permettrait à mettre en place de futures études pré-cliniques.

L'utilisation de culture de cellules tumorales in vitro ne permet pas l'étude de la progression tumorale dans son environnement global (angiogénique, inflammatoire et immun). Ce modèle de souris est le seul existant dans le monde mimant parfaitement le développement progressif de ce groupe de cancer pulmonaire. Pour obtenir des résultats statistiquement analysables, il faut beaucoup d'individus et beaucoup de tumeurs : le choix d'un modèle murin est donc primordial de part leur reproduction très rapide et les conditions d'élevages.

Pour l'ensemble de ce projet (entretien de la lignée animale, banque de liquides et de tissus issus des animaux ayant le cancer et des animaux sains, de même fonds génétique) nous utiliserons 111 souris. Tous les animaux générés pour ce projet seront utilisés.

La règle des 3R sera appliquée :

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles.

Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : des points limites ont été établis, pour définir à quel moment euthanasier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

Replace (Remplacer) les modèles animaux : pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'infections virales sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme où le système immunitaire joue un rôle important. Ceci ne peut donc pas être étudié in vitro.

**9090** Les maladies métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à une accumulation excessive de lipides dans le foie et à une dyslipidémie systémique. Cette accumulation anormale de lipides va induire un stress inflammatoire provoquant le développement d'une stéatohépatite. La stéatohépatite va alors provoquer un dérèglement des fonctions hépatiques allant de la cirrhose au cancer du foie. La dyslipidémie systémique est fortement liée à l'insuffisance hépatique et est impliquée dans le développement des complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie) et macrovasculaires (athérosclérose). Il est bien établi aujourd'hui que les macrophages tissulaires et les monocytes circulants (cellules de système immunitaire inné) jouent un rôle important dans la mise en place du diabète, de la stéatohépatite et de la dyslipidémie. Cependant les acteurs moléculaires sont moins bien connus. Récemment nous avons identifié deux protéines IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) et Elovl 2 (Fatty Acid Elongase 2) comme des modulateurs de l'activation inflammatoire des macrophages dans le contexte du diabète. Leurs rôles dans l'inflammation hépatique et dans l'activation des monocytes circulants restent cependant énigmatiques. Dans ce projet, nous souhaitons démontrer le rôle de ces 2 protéines dans les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement des comorbidités hépatiques et complications vasculaires du diabète de type-2. Pour ceci, nous allons appliquer différents modèles connus pour induire une stéatohépatite (régimes, traitement pharmacologique et chirurgie) dans les souris sauvages et les souris Elovl2 et IRF5 invalidées spécifiquement dans les cellules de l'immunité innée. Des données préliminaires (non-publiées) chez l'homme démontrent une dérégulation de l'action de Elovl2 et IRF5, confortant fortement notre hypothèse de travail.

La recherche animale est indispensable pour ces études, nous devons développer et caractériser des nouveaux modèles murins pour récapituler les maladies humaines, cela nous aidera à déchiffrer les acteurs pathologiques dans le diabète et ses complications. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée, par exemple, pour les études cellulaires, nous allons remplacer les

modèles murins par l'utilisation des lignées cellulaires, les mêmes souris seront utiliser pour plusieurs projets d'équipe afin de réduire le nombre total des souris sous expérimentation. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux.

Nombre d'animaux utilisés : 400 souris (20 souris par groupe et par conditions expérimentales)

Protocole expérimental : étude du phénotype métabolique, inflammatoire des souris invalidées pour IRF5 et Elovl2 spécifiquement au niveau des macrophages et monocytes (IRF5 et Elovl2 MacKO) soumis à un régime normal, un régime riche en graisse, régime riche en graisse-déficient en choline, suite à une ligation des voies biliaires et un traitement pharmacologique pro-fibrosant.

**9091** Les troubles du spectre autistique (TSA) constituent un ensemble hétérogène d'anomalies neuro-développementales précoces, définis cliniquement par des déficits d'interaction sociale et de communication, associés à un répertoire de comportements restreints et stéréotypés. Dans ce projet, nous testerons l'hypothèse qu'au cours du développement, certaines mutations de gènes candidats (G) sensibilisent le cerveau à l'impact négatif d'un facteur environnemental (E) et que cette interaction (GxE) précipite les TSA.

Notre objectif est donc de générer un nouveau modèle de souris TSA pour étudier l'interaction entre un facteur de susceptibilité génétique - mutation d'un gène et un facteur de risque environnemental - exposition in utero à l'acide valproïque (VPA), sur les anomalies du développement cortical et les troubles comportementaux qui en résultent.

En effet, l'acide valproïque (VPA - ou valproate de sodium et ses dérivés, valproate semisodique, valpromide, Dépakine®, Micropakine®, Dépakote® ou Dépamide® et génériques) est utilisé en neurologie comme antiépileptique et comme thymorégulateur dans les troubles bipolaires, ainsi que pour le traitement de certaines céphalées. L'exposition prénatale au VPA est un facteur environnemental associé à des anomalies du développement neurologique, un faible quotient intellectuel (QI), un retard des apprentissages et un risque relatif augmenté de ~ 10 fois de TSA. Les modèles VPA chez les rongeurs (rat et souris) présentent une forte validité anatomique, physiologique et comportementale.

Au laboratoire, nous avons des modèles de souris transgéniques pour des gènes impliqués dans des troubles neuropsychiatriques incluant l'épilepsie et les TSA. Ces modèles présentent des anomalies du comportement comme l'hyperactivité, des défauts de communication et d'interaction sociale et des comportements stéréotypés.

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Réduction

Nous réduisons le nombre d'animaux en combinant plusieurs approches expérimentales sur une même lignée. Par ailleurs, pour minimiser la quantité d'animaux produits, nous nous efforçons d'inclure dans une procédure la grande majorité des animaux issus de l'élevage. De même, tous les animaux générés (femelles et mâles) sont utilisés.

De plus, quand cela est possible, un même animal est utilisé successivement pour des études de comportement, puis pour des études anatomiques ou biochimiques et la réalisation de séries de coupes par cerveau nous permet de réaliser plusieurs marquages différents pour un même cerveau. D'une manière générale, nous avons conçu les lots pour que soit généré le nombre optimal d'animaux compatible avec la réalisation des tests.

Nos connaissances des protocoles nous ont permis d'évaluer le nombre d'animaux au plus juste pour chaque expérience, en tenant compte de l'importance de l'effet attendu pour assurer une parfaite robustesse des résultats.

- Raffinement

Nos activités impliquent toujours une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les animaux sont maintenus dans un environnement confortable, sain et sécurisant et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences de comportement, nous prenons toutes les précautions pour ne jamais stresser les animaux. Les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie et antalgiques, avec un suivi post-chirurgicale particulier (suivis du réveil et de la cicatrisation). En cas de comportements anormaux (stéréotypies, léthargie ou manque

d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. En cas de souffrance, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes adaptées.

- Remplacement

Les questions que nous posons dans ce projet concernent des aspects très intégrés de maturation du cortex et des fonctions cognitives qui sont affectés chez les individus exposés au VPA. Pour tous les autres aspects de notre recherche pouvant être adressées in vitro (biochimie et de biologie cellulaire), nous utiliserons des lignées cellulaires et des cellules souches embryonnaires afin de limiter le nombre d'animaux.

La souris est le modèle mammifère de choix du fait de nombreuses lignées transgéniques qui permettent de cibler spécifiquement le gène d'intérêt et l'arrière-fond génétique dans lequel ce gène s'exprime. Ce modèle est incontournable pour :

- comprendre les mécanismes d'action du VPA et accélérer le développement de nouveaux traitements dans l'avenir

- aider à l'identification des susceptibilités génétiques et individus à risque et optimiser une médecine personnalisée pour les patients,

- identifier les risques pour la deuxième génération des individus exposés.

Cette étude nécessitera un total de 2064 souris.

**9092** Cliniquement, la maladie de Parkinson (MP) est principalement caractérisée par des symptômes moteurs qui résultent de la dégénérescence des neurones dopaminergiques localisés dans une zone précise du cerveau : la pars compacta de la substance noire. Cependant, la MP est très souvent accompagnée de troubles cognitifs, neuropsychiatriques et du système autonome qui reflètent des dysfonctionnements au-delà du système dopaminergique. Les processus neurodégénératifs liés à la MP sont de type et d'évolution variables selon les individus.

L'objectif de notre projet est d'identifier par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle à l'état de repos (rs-fMRI, pour resting state functional magnetic resonance imaging,) des biomarqueurs fiables spécifiquement associés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques et non aux autres atteintes observées dans la maladie. Pour cela, nous rechercherons en rs-fMRI dans le cerveau de souris parkinsoniennes des connexions neuronales altérées pouvant être considérées comme des biomarqueurs de la pathologie. Notre projet nécessite des modèles animaux, car il est impossible à ce jour de reproduire ce type de pathologie à l'échelle d'un cerveau in vitro ou in silico. Les résultats obtenus seront comparés avec ceux observés chez les patients parkinsoniens. Puis ces biomarqueurs seront validés sur deux modèles animaux de la MP en examinant notamment leur variation en fonction de la sévérité de la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Ce projet est une collaboration entre deux laboratoires. Le premier laboratoire réalise la préparation des modèles animaux (induction de la MP) et il dispose d'une autorisation de projet. Le protocole expérimental réalisé dans notre laboratoire comprend pour certains animaux une préparation chirurgicale sous anesthésie et analgésie avant la réalisation d'examens non invasifs par imagerie IRM. Il a été mis au point de façon à ne provoquer aucune angoisse, douleur ou souffrance chez les animaux. Les procédures d'anesthésie et d'analgésie ont donc été définies et validées par une équipe vétérinaire. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer de leur bien-être. Dans le cas d'effet inattendu, le vétérinaire de l'installation sera alerté pour mettre en œuvre les traitements appropriés ou de décider de l'euthanasie. Le nombre de souris (150) a été réduit au minimum nécessaire pour recueillir un nombre suffisant de données pour une analyse statistique valide. Chaque test sera pratiqué sur des groupes de 10 animaux.

Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

**9093** Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours de deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent leur détection par les différentes techniques d'imagerie.

Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base de Gadolinium. Les premières études réalisées avec ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes méthodes d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive. Il est maintenant indispensable de les modifier pour qu'elles reconnaissent les tumeurs de manière spécifique. Cela permettra d'améliorer le diagnostic et de réaliser un suivi de l'effet du traitement. Une étude réalisée *in vitro*, nous a déjà permis de montrer qu'en modifiant les particules elles pouvaient reconnaître spécifiquement les cellules tumorales.

Nous voulons maintenant étudier la biodistribution de ces nanoparticules dans des modèles de cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) et évaluer leurs propriétés radiosensibilisantes pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Nous évaluerons également si leur utilisation, couplée à des techniques d'imagerie optique, améliore la qualité de la résection tumorale *in vivo*. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Dans ce cadre, les souris nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité.

Les souris seront surveillées quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Nous travaillerons sur deux modèles orthotopiques de cancer des VADS. Nous réaliserons des implantations intra-jugales de copeaux tumoraux obtenus à partir de tumeurs des VADS sous-cutanées. Une tumeur implantée en sous-cutanée chez une souris nude permettra l'implantation de tumeurs orthotopiques chez 6 souris. Ce modèle d'implantation orthotopique permettra de ralentir la croissance tumorale et d'augmenter la survie des souris. La chirurgie sera faite sous anesthésie et des analgésiques.

Dans ce projet, nous utiliserons 177 souris pour chaque modèle orthotopique, soit un total de 354 souris, correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaire pour une analyse fiable des différents résultats.

En effet, d'après notre expérience, pour les expériences de biodistribution par imagerie *in vivo*, 3 animaux par condition expérimentale permettent une analyse fiable des données de biodistribution, en prenant en compte les variabilités inter-individu. D'autre part, pour les expériences d'évaluation d'un effet thérapeutique, 10 souris par conditions sont nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

**9094** Ces dernières décennies ont vu une augmentation des cas de rhinite allergique dans les pays industrialisés. La rhinite allergique est une affection caractérisée par une sensibilité à un allergène : pollen (rhinite saisonnière), acariens de la poussière de maison, phanères d'animaux (chat, chien). Elle se manifeste par des éternuements, des démangeaisons, un écoulement nasal clair et une sensation de nez bouché. Il n'existe aucun traitement curatif. Les traitements prescrits réduisent les symptômes ou limitent l'inflammation. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement présentent des effets indésirables indéniables. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouveaux traitements anti-inflammatoires efficaces présentant moins d'effets secondaires. Notre objectif est donc d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans un modèle d'inflammation des voies aériennes supérieures, représentatif de la rhinite allergique chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale répond aux administrations d'allergène par une réponse inflammatoire de type allergique qui permet l'étude et le développement de médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré pour permettre de modéliser une réaction inflammatoire complexe et d'évaluer l'efficacité d'une molécule. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour s'assurer de l'activité des nouveaux candidats-médicaments.

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. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages de grande taille 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, de 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 l'euthanasie 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 de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale, parfaitement maîtrisée, permet d'obtenir des résultats fiables avec 8 souris par groupe. Il est prévu d'évaluer l'activité de 8 candidats-médicaments par an, pour un total de 256 souris. Nous envisageons donc l'utilisation d'un maximum de 1280 souris sur une période de 5 ans.

**9095** Notre projet est centré sur l'étude des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs des neuropeptides et autres molécules d'intérêt. L'objectif de ce projet est de réaliser un élevage de souris Swiss afin d'effectuer des cultures primaires de cellules en grain du cervelet pour tester l'effet des peptides sur la survie, la motilité et la différenciation des neurones. Ce modèle animal est indispensable pour étudier le potentiel thérapeutique de certaines molécules dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Des tests in vivo doivent obligatoirement être menés chez l'animal si l'on souhaite utiliser de nouvelles molécules chez l'Homme dans le traitement de maladies neurodégénératives.

Notre demande d'autorisation d'expérimentation animale porte sur l'entretien d'une lignée de souris Swiss pour la mise en culture des cellules en grain du cervelet.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation du protocole.

Le nombre de souris incluses dans le projet est lié au nombre de neuropeptides et molécules d'intérêt à tester ainsi qu'à la nature des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats. Nous utiliserons des souriceaux âgés de 4 jours dans un modèle de cultures primaires de cellules en grain du cervelet car à ce stade l'épaisseur de la couche granulaire externe du cervelet est maximale et permet d'obtenir un grand nombre de cellules avec un taux de pureté élevé à partir d'un nombre limité d'animaux. Nousensemencerons également nos cellules en plaques 24 puits afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour tester l'effet neuroprotecteur ou neurotoxique de ces molécules. Ainsi, 3380 souriceaux seront inclus dans le projet sur une période de 5 ans à raison d'une reproduction d'animaux Swiss par semaine, chaque femelle ayant en moyenne une portée de 13 petits. Les animaux non utilisés pour la culture primaire de cellules en grain du cervelet seront sevrés à l'âge de 21 jours afin d'assurer le renouvellement des reproducteurs. 15 souris Swiss étant nécessaires pour démarrer l'élevage, 3395 animaux seront nécessaires à la réalisation du projet.

L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des souris permettront de détecter rapidement et de limiter la souffrance des animaux, et de s'assurer de leur bien-être.

**9096** La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements pharmacologiques actuels montrent une efficacité limitée, tout particulièrement au stade chronique de la maladie (plus de 15 jours de migraine par mois). Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est donc indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Nous proposons pour ce projet d'évaluer les effets d'un agoniste des récepteurs delta opioïdes (molécule d'intérêt) dans un modèle de migraine par donneur de monoxyde d'azote (NO) chez le rat (mâle et femelle). L'étude et l'analyse de la douleur ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives à celle d'animaux vivants. En effet, la douleur est le résultat de mécanismes complexes intégrés au sein d'un système nerveux central. Chez le rat mâle et femelle, nous testerons l'hypersensibilité cutanée faciale développée à la suite d'injections

intrapéritonéales (ip) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg), connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche aussi chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales du passage au stade chronique de la migraine est l'hypersensibilité à la douleur mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets de la molécule d'intérêt sur la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique (retrait de la face) de rats soumis à 1 (stade aigu) ou 5 injections répétées (stade chronique, 1 injection / jour / 5 jours) d'ISDN. Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN (comme chez l'homme). L'effet de la substance sera testé à la suite d'une injection intrapéritonéale de SNC80 et comparé à un groupe témoin négatif (serum physiologique NaCl 0.9%) et à un groupe témoin positif correspondant à l'injection d'un antimigraineux de référence, le sumatriptan.

3 groupes de rats seront donc utilisés (serum physio, sumatriptan et la molécule d'intérêt). Dans chaque groupe, les 2 sexes seront représentés ce qui portera le nombre de rats / groupe à n=20. De plus, 2 procédures seront utilisées : 1 aiguë (effet du composé sur l'allodynie après 1 injection d'ISDN) et 1 chronique (effet du composé sur l'allodynie lors de la 5ème injection d'ISDN). Ainsi, chaque procédure nécessitera 60 animaux (2 sexes) et donc au total 120 animaux seront utilisés dans ce projet.

Le nombre d'animaux par groupes et du nombre de groupes est réduit au maximum tout en permettant une discrimination des effets antalgiques potentiels. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international « Association for the Study of Pain » puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions d'injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie mettrait fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection de haute dose d'anesthésique. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de chaque procédure par injection létale d'anesthésique.

Par ce projet, nous entendons montrer et caractériser chez le rat le pouvoir antalgique (supérieur au traitement de référence) de la molécule d'intérêt dans le cas de la douleur (allodynie) migraineuse aussi bien au stade aigu que chronique.

**9097** La maladie du sommeil touche une population estimée à 100 millions de personnes sur le continent africain et couvrant plus de 37 pays. Côté animal, plus de 100 millions de petits ruminants sont directement concernés. Ces maladies dues à des parasites appelés trypanosomes et transmises par des insectes (glossines essentiellement) sévissent dans des zones rurales pauvres des pays africains et constituent un obstacle majeur à l'installation humaine et au développement de l'élevage et de l'agriculture avec un fort impact socio-économique pour des populations déjà fortement appauvries. Des moyens de lutte existent, basés sur l'assainissement des réservoirs animal et humains du parasite, la réduction des populations d'insectes vecteurs par l'utilisation d'insecticides, d'écrans et pièges imprégnés, d'épandages et l'utilisation d'outils diagnostiques et de traitements curatifs, mais bien qu'utilisés de façon raisonnée et intégrée, ils montrent de plus en plus leurs limites (chimiorésistances développées par les insectes et les parasites par exemple).

Nos travaux s'inscrivent dans un souci d'amélioration des outils diagnostiques existants (amélioration et développement de tests de dépistages), d'identification de molécules ayant une action curative ou préventive, de mise au point d'un vaccin efficace pour protéger les populations humaines et animales et enfin, d'amélioration des outils de la lutte contre le vecteur. Pour mener à bien ces activités il est indispensable de produire des parasites en quantité, ce qui ne peut se faire que par inoculation et



multiplication chez les rongeurs (rats et souris). A cette fin, un maximum de 790 souris et 100 rats seront utilisés sur une période de 5 ans. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de remplacer les animaux pour produire les parasites nécessaires à ces recherches. Néanmoins le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum tout en permettant l'exploitation statistique des résultats. L'hébergement en groupe des animaux et l'enrichissement de leur milieu ainsi que l'utilisation d'anesthésiques et le respect des critères d'interruption des expériences, permettront la prise en compte du raffinement.

**9098** L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie extrêmement sévère causée par l'obstruction des petites artères pulmonaire (les artères qui conduisent le sang vers les alvéoles pulmonaires pour y être oxygéné). La conséquence de cette obstruction est la défaillance du ventricule droit. En effet, dans l'HTAP, le ventricule droit doit pomper le sang dans un lit vasculaire pulmonaire de plus en plus bouché, ce qui amène une fatigue cardiaque dans un premier temps, puis une insuffisance cardiaque.

A l'exception de la transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire, il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la maladie. Les traitements disponibles sont des médicaments orphelins, dont le prix du traitement par patient par année peut varier entre 25 000 et 150 000 €. Parmi les médicaments les plus chers en France, on trouve le Remodulin qui traite l'HTAP pour un coût de 15 807,45 € l'unité soit 125 000 € le traitement à l'année. Malgré ces coûts élevés, le pronostic de l'HTAP reste effroyable avec une survie à 3 ans de l'ordre de 60% dans les formes incidentes de la maladie.

Face au coût élevé pour la société que représente le traitement de l'HTAP et à la sévérité de cette maladie, il est urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons identifié l'inflammation comme un mécanisme central dans le développement et l'entretien de l'HTAP.

Le but de ce projet est d'étudier l'effet d'une molécule aux propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices reconnues et actuellement utilisée pour traiter les patients atteints d'asthme allergique, une autre maladie inflammatoire pulmonaire chronique, dans le modèle expérimental d'HTAP induit chez le rat par l'hypoxie chronique.

Nous respecterons le principe de la règle des 3 R dans notre approche expérimentale :

Remplacer : Grâce à la disponibilité de tissus humains dans notre laboratoire rattaché à un centre de chirurgie thoracique, nous avons la possibilité de travailler directement sur les tissus et les cellules de patients souffrant d'HTAP, évitant l'utilisation d'animaux dans certaines expériences d'investigation fondamentale.

Réduire : Le calcul de la puissance de nos expériences et la prédiction des effectifs à utiliser ont été déterminés grâce au logiciel GPower. Ceci permet de déterminer le nombre minimal d'animaux à utiliser pour atteindre les objectifs statistiques fixés.

Raffiner : Grâce aux méthodes non invasives d'évaluation de la fonction cardio-pulmonaire présentes dans notre laboratoire, comme l'échocardiographie, nous pouvons réduire le recours à des mesures invasives potentiellement douloureuses comme le cathétérisme cardiaque droit.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques.

De l'enrichissement sera ajouté dans la cage des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement avec un entretien réalisé dans des conditions soigneusement contrôlées pour qu'ils ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 104 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par des expérimentateurs ayant suivi la formation d'habilitation à l'expérimentation animale.

**9099** Les muqueuses représentent la voie principale d'entrée de la majorité des agents pathogènes. La vaccination muqueuse permet l'induction de réponses immunitaires au niveau de ces muqueuses mais reste à ce jour inefficace.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie de vaccination basée sur un ciblage vaccinal des muqueuses à l'aide d'anticorps.

Nous souhaitons en particulier étudier les réponses immunitaires induites par cette stratégie vaccinale chez la souris et le lapin.

Ces études ne peuvent se faire *in vitro* car le but est de suivre l'activation physiologique du système immunitaire de l'animal après immunisation par voie orale ou nasale. Le modèle murin et lapin sont des modèles de référence pour évaluer la réponse humorale. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique.

Le nombre total de souris a été fixé à 210 souris et 30 lapins soit au maximum 240 animaux au total. Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Les prélèvements sanguins s'effectueront sous anesthésie générale.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/ analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

**9100** Une des questions majeures en Neurosciences est de savoir comment une mémoire spécifique est formée et est stockée dans le cerveau. L'hippocampe et le cervelet sont deux structures qui jouent un rôle central dans la mémoire spatiale. L'étude des propriétés morpho-fonctionnelles des neurones hippocampiques et du cervelet activés lors d'une tâche de navigation spatiale demeure une question fondamentale en Neurosciences. Nous nous proposons d'étudier les propriétés morpho-fonctionnelles *ex vivo* sur des tranches de cerveaux de différents types neuronaux dans l'hippocampe et le cervelet activés dans un contexte d'exploration spatiale. L'hippocampe est également une structure fortement impliquée dans des pathologies telles que l'épilepsie du lobe temporal. L'épilepsie est une pathologie neurologique fréquente. Elle se manifeste par des crises de natures variées (pertes de connaissance brusques, troubles du comportement, difficultés à s'exprimer, troubles de la vision, mouvements anormaux, etc.) liées à une hyperactivité anormale du cerveau. Un aspect méconnu de cette maladie est qu'en dehors des crises d'épilepsie les patients épileptiques souffrent souvent de troubles cognitifs tels que des déficits de mémoire. Le projet vise à étudier les circuits neuronaux à la base des altérations du traitement de l'information, du codage neuronal et de la mémoire spatiale dans un contexte d'épilepsie du lobe temporal.

Les animaux qui seront utilisés sont des souris (*Mus Musculus*) et des rats (*Rattus Norvegicus*). Le nombre total d'animaux prévu dans ce projet pour une durée de 5 ans est de 920 (92 rats mâles adultes et 828 souris mâles adultes). Les animaux utilisés seront des mâles pour éviter une variabilité des résultats liée aux cycles menstruels. Nous mettrons en œuvre la "règle des 3 R". Le remplacement des animaux par des approches *in vitro* n'est pas possible puisqu'il s'agit ici de caractériser les propriétés morpho-fonctionnelles de neurones de l'hippocampe et du cervelet activés lors d'un contexte d'apprentissage pour une tâche de mémoire spatiale et dans un contexte pathologique. En revanche, nous réduisons fortement le nombre d'animaux utilisés en maximisant, par animal, les enregistrements réalisés *ex vivo* sur tranches de cerveaux maintenues en survie artificielle de multiples neurones dans deux structures cérébrales différentes (l'hippocampe et le cervelet). Enfin tout est mis en œuvre pour réduire le stress au minimum ; les souris seront maintenues en hébergement isolé du fait de la restriction hydrique nécessaire au protocole mais avec des contacts visuels et olfactifs et en milieu enrichi (bâtonnets de bois, maison et/ou tunnel en carton, matériel pour le nid). De plus, les souris seront habituées progressivement aux protocoles comportementaux et aux manipulateurs. Les chirurgies seront réalisées en anesthésie profonde et les douleurs post-opératoires seront traitées par l'utilisation d'anti-inflammatoires et d'antalgiques adaptés.

En conclusion, le projet est de caractériser les propriétés morpho-fonctionnelles de neurones de la formation hippocampique et du cervelet dans un contexte d'apprentissage pour une tâche de mémoire spatiale et dans un contexte pathologique. Cette étude sera réalisée *in vivo* durant la tâche comportementale et *ex vivo* sur des tranches de cerveaux à partir d'animaux entraînés, d'animaux épileptiques et d'animaux contrôles (non-entraînés et non épileptiques).

**9101** Au cours de leur prise en charge thérapeutique, environ un patient sur deux atteint d'un cancer recevra un traitement par radiothérapie (RT).

Les techniques de RT ont beaucoup évolué durant les 15 dernières années et permettent à l'heure actuelle de délivrer de hautes doses de radiations au niveau de la tumeur tout en évitant au maximum les organes sains avoisinants afin de réduire les toxicités.

Jusqu'à récemment, et de façon surprenante, les techniques de RT disponibles pour les projets de recherche sur le petit animal n'ont pas suivi cette évolution technologique. Ainsi les projets de recherche précliniques utilisant de la RT délivraient aux animaux un traitement comparable à ceux délivrés aux patients dans les années 1980.

Depuis 2016, notre établissement a fait l'acquisition d'un appareil de radiothérapie 3D guidé par l'image pour le petit animal permettant de délivrer des traitements similaires à ceux délivrés aux patients. En parallèle à cette évolution technologique, de nouvelles molécules ou dispositifs ont été développés (nano-médicaments, immunothérapies...) et leur association avec de la RT est très prometteuse.

De nombreux industriels ou chercheurs souhaitent à présent optimiser l'association de telles molécules avec de la RT moderne. Notre plateforme leur propose ainsi des prestations de services de RT préclinique afin de développer de tels projets. Les partenaires auront dans un premier temps obtenus des résultats *in vitro* qui auront permis de fixer les doses de molécules et de RT à tester *in vivo*, les plus efficaces possible (Remplacement).

Les souris, qui arriveront dans notre service pour être irradiées, seront déjà porteuses de tumeurs murines ou humaines. Les traitements par RT pourront être délivrés en une fraction unique ou en une fraction par jour sur un maximum de 21 jours. Les séances de radiothérapie sont réalisées sous anesthésie gazeuse et dureront entre 1 et 20 minutes selon la dose délivrée.

Pour certains traitements, des techniques complexes nécessiteront l'acquisition d'une imagerie par scanner avant traitement par RT. Dans ce cas, les animaux seront anesthésiés durant au maximum 50 minutes, temps nécessaire pour réaliser le scanner, préparer et délivrer le traitement par RT.

Afin de limiter le stress des animaux traités sur plusieurs jours (plusieurs séances de RT) nous pourrons les héberger et les suivre quotidiennement dans l'animalerie de notre établissement durant la durée du traitement afin de leur éviter des transports quotidiens (Raffinement). Pour les cinq prochaines années nous prévoyons de réaliser ce type de prestation de service pour 20 expériences par an avec en moyenne 50 animaux irradiés par expérience. Les groupes contrôles seront transportés et hébergés au même endroit que les groupes traités afin de limiter la variabilité des résultats et ainsi de réduire le nombre de souris nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables (Réduction)

Ainsi jusqu'à 1000 souris par an pourront être irradiés, durant 5 ans. Cette présente demande concerne donc 5000 souris.

**9102** Chaque individu perçoit en permanence des stimuli environnementaux qui peuvent modifier de façon pérenne son comportement. Parmi eux, le stress déclenche un large éventail de réponses qui sont adaptatives quand elles sont correctement régulées. Toutefois, de par sa chronicité, le stress peut favoriser l'apparition de nombreux troubles mentaux dont la dépression.

Notre projet vise à comprendre comment des changements moléculaires engendrés par le stress sous-tendent l'apparition de modifications comportementales liées à la dépression. Les maladies mentales se classent au deuxième rang des causes mondiales de handicap. L'impact social et économique de ces troubles est donc considérable, et nécessite un accès fréquent aux hospitalisations. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces troubles sont encore méconnus ce qui freine l'avancée de nouvelles thérapies. Afin de comprendre les mécanismes reliant le stress aux troubles psychiatriques qui en découlent, notre équipe s'intéresse à une structure cérébrale, le striatum, qui est fortement sensible au stress. Au sein de cette structure, le stress entraîne un déséquilibre de messagers chimiques (dopamine et glutamate) qui se répercute sur les récepteurs de ces molécules (récepteurs à la dopamine et au glutamate). Nos travaux préliminaires ont montré qu'un stress chronique augmentait la formation de complexes (i.e. hétéromères) entre ces deux types de récepteurs. Nous possédons des outils pharmacologiques permettant de bloquer la formation de ces complexes.

Le présent projet aura donc trois objectifs principaux : i) Établir une cinétique de la persistance de ces complexes après exposition à un stress social chronique. ii) Étudier les changements d'activité causés par le stress au sein du striatum, et le rôle de ces complexes de récepteurs dans ces processus. iii) Étudier le potentiel bénéfique thérapeutique de cibler ces complexes de récepteurs afin d'améliorer les troubles comportementaux liés au stress

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en quatre procédures. Nous combinerons des approches moléculaires, électrophysiologiques et comportementales et utiliserons des outils viraux permettant de cibler de façon sélective ces complexes de récepteurs. i) Procédure 1 : Effet d'un stress social sur l'hétéromérisation des récepteurs à la dopamine et au glutamate. Dans cette procédure histologique, nous quantifierons le nombre d'hétéromères induit par le stress et déterminerons si ces changements perdurent. ii) Procédure 2 : Rôle des hétéromères dans les manifestations comportementales associées au stress. Dans cette procédure nous essayerons de bloquer et de réverser les troubles comportementaux induits par le stress. iii) Procédure 3 : Rôle des hétéromères dans les adaptations cellulaires liées au stress. Dans cette procédure électrophysiologique, nous mesurerons les changements d'activité des neurones du striatum suite à un stress et étudierons le rôle des hétéromères dans ces processus. iv) Procédure 4 : Impact du stress et rôle des hétéromères sur un marqueur moléculaire de la plasticité synaptique au sein du striatum. Dans cette procédure, nous évaluerons l'activation d'une protéine kinase du striatum suite à un stress.

L'ensemble du projet nécessitera 2076 mâles adultes sauvages. Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R : Remplacement : La souris est le modèle animal ayant le moindre potentiel de douleur chez lequel la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress chez l'homme est conservée. Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu. Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress non contrôlé des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via grille de score en annexe, définition de points-limite précoces et adaptés).

**9103** L'asthme allergique, maladie inflammatoire des voies respiratoires affecte la qualité de vie d'une personne sur dix en France et ce nombre est en constante augmentation. Pourtant, les traitements ne sont pas toujours efficaces, peu spécifiques et induisent des effets secondaires. Il est donc urgent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'asthme afin de développer de nouvelles thérapies plus ciblées. L'asthme est induit par la présence d'allergènes (pollens, acariens, ...), associée à des prédispositions génétiques. Parmi ces dernières, l'interleukine33 et son récepteur st2 sont deux gènes majeurs de susceptibilité. L'interleukine 33 (IL33), fortement exprimée par les cellules du poumon a un rôle crucial dans l'initiation de l'inflammation allergique et l'obstruction des bronches. Son expression augmente dans les biopsies de poumons de patients et dans le lavage broncho-alvéolaire des cas sévères. L'intérêt qui lui est porté est grandissant depuis la découverte de ses cellules cibles majeures, les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), impliquées dans le développement des maladies allergiques. Les mécanismes de recrutement de ces cellules dans les poumons sont pourtant mal compris et le rôle d'autres cellules activées par l'IL-33 est sous-estimé. L'IL-33 est également impliquée dans les exacerbations de l'asthme par les infections virales, menant aux crises les plus graves, parfois mortelles. Les mécanismes d'amplification de l'allergie par les virus respiratoires ne sont pourtant pas bien compris. L'IL-33 est impliquée dans plusieurs composantes de la maladie, et ce projet vise à obtenir une meilleure compréhension de son mécanisme d'action afin de développer de nouveaux traitements permettant de surmonter les limites de la thérapie actuelle. Nous proposons d'étudier les dynamiques des cellules cibles de l'IL-33 dans des modèles murins d'inflammation allergique et d'exacerbation virale, notamment grâce à l'utilisation de la microscopie intravitale du poumon qui permet d'observer en temps réel et dans leur environnement naturel les migrations et interactions cellulaires. Nous analyserons le rôle de l'IL-33 dans ces

dynamiques ainsi que le rôle respectif des cellules cible dans les différents paramètres de la pathologie (inflammation allergique, remodelage de l'épithélium, exacerbation virale de l'allergie,...). Réduire : Le projet nécessite l'utilisation de 2808 souris sur 5 années. Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Le nombre d'animaux donné est fixé sur le maximum nécessaire. En effet, les premières parties du projet donneront des indications afin d'étudier uniquement les cellules cibles clés, le nombre d'animaux pourrait ainsi être réduit.

Raffiner : Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommages durables que pourraient subir les animaux. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie pour réduire l'angoisse des animaux. Le suivi des animaux après chaque procédure sera journalier (poids et température de l'animal, aspect extérieur) avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint.

Remplacer : Le développement de l'inflammation allergique et le remodelage de l'épithélium observés chez les asthmatiques est un phénomène complexe impliquant de multiples mécanismes interconnectés et plusieurs acteurs cellulaires (cellules du poumon, cellules hématopoïétiques circulantes et résidentes, ...). L'observation et la compréhension des dynamiques migratoires des cellules impliquent donc la conservation de conditions physiologiques (circulation sanguine et lymphatique) qui nécessitent des modèles animaux. Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants, celles-ci ne pouvant pas apporter le même niveau d'information. Les modèles d'inflammation allergique et d'exacerbation virale pertinents seront des modèles murins. En effet, l'existence de souris transgéniques déficientes en IL-33 ou des souris permettant l'observation, l'identification ou l'élimination in vivo de certaines populations immunitaires, permettra de déterminer le rôle de la cytokine et de ces différentes populations dans le développement de la pathologie. Seule l'espèce murine offre ces modèles transgéniques.

**9104** La maladie d'Alzheimer est une affection cérébrale représentée par une démence neurodégénérative qui conduit à des troubles de la mémoire, du langage et des fonctions intellectuelles chez les personnes âgées. Ces symptômes sont la conséquence conjointe d'une dégénérescence neurofibrillaire et de l'apparition de plaques séniles induites par l'accumulation du peptide amyloïde (abeta), conduisant à la mort neuronale. La maladie d'Alzheimer se présente sous une forme soit génétique, ne représentant qu'un faible pourcentage de la population atteinte, soit sporadique, qui est la conséquence d'un ensemble complexe d'éléments touchant à la génétique, à notre environnement et à notre style de vie. Par ailleurs, c'est le vieillissement qui représente le plus grand facteur de risque de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer. Afin de mieux comprendre et de développer des traitements préventifs pour cette pathologie, des modèles animaux de la maladie sont nécessaires.

A l'heure actuelle, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer utilisés en laboratoire présentent essentiellement les mutations familiales rares (PSEN1, PSEN2 et APP). Malheureusement pour la communauté scientifique, ces animaux ne reproduisent pas entièrement les signes cliniques pathologiques observés chez l'homme. Une des raisons évidentes est que certains marqueurs de la pathologie, par exemple les déficiences mitochondriales, ne sont pas intégrées dans les modèles d'étude actuels. Par ailleurs, un modèle d'étude de déficit mitochondrial seul, n'engendrerait pas tous les changements histologiques observés chez l'homme lors de la mise en place de la pathologie.

L'objectif de cette étude est de pouvoir établir un modèle plus pertinent de la maladie d'Alzheimer en induisant le déficit mitochondrial dans un modèle de souris transgéniques existant afin de refléter de manière plus complète la complexité de la maladie d'Alzheimer de forme sporadique, dans le but évident de la diagnostiquer et d'en comprendre le développement de manière beaucoup plus précoce.

Un nouveau modèle viral induisant le dysfonctionnement mitochondrial lié à l'âge a déjà été développé. Ce virus est basé sur l'inhibition partielle de la sous-unité oxydase 4 du cytochrome c (Cox4) de complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. In vivo, son injection stéréotaxique chez la souris aboutit à une réduction marquée de la densité de certains marqueurs synaptiques dans les neurones.

Pour ce projet, la combinaison de ce modèle mitochondrial avec les modèles de souris transgéniques existants sera réalisée par l'injection de vecteurs lentiviraux exprimant miRNA Cox4-spécifique dans des zones cérébrales d'intérêt pour la maladie d'Alzheimer (hippocampe). Les animaux seront analysés dans un test comportemental, la piscine de Morris, qui permet de quantifier les déficits cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer en évaluant les fonctions de mémoire et d'anxiété. La communication neuronale, la plasticité synaptique et la mort neuronale seront examinées sur des coupes cérébrales, en combinant analyses électrophysiologiques et histologiques. De même, les modifications épigénétiques du nouveau modèle d'étude sur l'ADN nucléaire et mitochondrial seront étudiées. Enfin plusieurs leads d'intérêt seront testés sur le modèle.

Pour ce projet, et dans le respect éthique de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) 196 souris seront utilisées. Une étude statistique prévisionnelle a permis de déterminer le nombre d'animaux. Lors de la phase expérimentale, des anesthésiques/analgésiques seront administrées aux souris. Dans un souci de raffinement, le bien-être des animaux sera attentivement suivi par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de minimiser toute souffrance, angoisse ou stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés.

**9105** Le projet présenté ici vise à mettre au point et caractériser un modèle animal innovant de schizophrénie. On ne sait pas à l'heure actuelle guérir de cette maladie psychiatrique grave qui touche 1% de la population et les traitements actuels ne sont hélas pas satisfaisants. Ils ne traitent en effet qu'une partie des symptômes et induisent des effets secondaires qui parfois aggravent les autres symptômes. Cette absence de traitements pourrait être due au fait que les modèles animaux de cette pathologie qui sont utilisés pour la recherche de ces traitements ne sont pas adaptés. En effet, ces modèles sont en général construits sur un seul facteur alors que l'on sait que la schizophrénie est une maladie multifactorielle (facteurs génétiques et facteurs environnementaux).

Notre projet est donc de construire un modèle animal qui alliera une prédisposition génétique (délétion partielle d'un gène) avec une perturbation environnementale post-natale précoce (séparation des souriceaux de leur mère pendant 24h à l'âge de 9 jours) et une perturbation tardive à adolescence (administration quotidienne de THC, l'un des composants du cannabis). Ces trois facteurs ont été choisis sur la base de la littérature. Les expériences consisteront à étudier les déficits comportementaux chez l'animal devenu adulte (tests d'activité, de mémoire, de sociabilité etc.) puis de tester les effets des médicaments actuels sur ces comportements. Ensuite les cerveaux (anatomie et fonctionnement) des animaux seront visualisés en imagerie cérébrale (IRM et TEP), puis les modifications cellulaires et moléculaires seront étudiées post-mortem. Plusieurs groupes d'animaux doivent être constitués pour connaître l'influence de chacun des trois facteurs (besoin de 96 souris dans un premier temps). Ce modèle, une fois validé, sera ensuite utilisé au sein du laboratoire pour évaluer les effets de molécules améliorant les fonctions cognitives (besoin de 72 souris), puis il sera diffusé à l'industrie pharmaceutique pour la recherche de nouveaux traitements. Le but ultime étant de trouver de nouveaux médicaments, efficaces sur les différents symptômes de la maladie.

Le nombre total d'animaux est de 168. Nous avons choisi de réduire le nombre des animaux au 12 par groupe afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques solides. La première procédure nous permettra de sélectionner les tests comportementaux les plus discriminants, que nous appliquerons ensuite au deuxième groupe. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables, contrôlées et avec un enrichissement minimum du milieu de manière à assurer un bien-être optimal.

**9106** Le rythme circadien est un rythme biologique calé sur un cycle d'une durée de 24 heures qui se répète et permet de réguler la plupart de nos fonctions biologiques et comportementales (veille/sommeil, circulation sanguine, la température corporelle etc.). Ce rythme est régulé à la fois par l'environnement (repères temporels nommés Zeitgeber par l'alternance jour/nuit) et à la fois par notre horloge interne (contrôle du système nerveux central), cela se traduit par des rythmes circadiens calés en fonction du temps. Chaque organe est soumis par l'horloge interne au rythme circadien nécessaire au maintien de l'intégrité des fonctions biologiques de l'organisme. Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme des glucides et des lipides, et est finement régulé dans le temps par le

rythme circadien. En effet, durant la période d'activité (jour), il a été observé la sécrétion de façon circadienne d'une hormone, l'insuline après chaque repas. Cette hormone agit sur le foie et permet de stocker le sucre en énergie pour anticiper le jeûne pendant la période d'inactivité (Nuit). La désynchronisation répétée du rythme circadien entraîne des développements de maladies tels que le diabète de type 2 et la maladie du foie gras. Inversement de mauvaises habitudes alimentaires peuvent altérer le métabolisme (défaut de réponse à l'insuline ou de sécrétion dans le sang de l'insuline) et entraîner une dérégulation du rythme circadien. Nous avons donc, dans un premier temps, l'objectif de déterminer l'influence de l'insuline (prise alimentaire) sur le rythme circadien hépatique. Dans un deuxième temps, notre objectif est de déterminer les effets du sexe sur la physiologie du foie. Afin de réaliser ces deux études, nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifié qui n'exprimera plus une protéine de la voie de l'insuline uniquement dans le foie après injection d'un produit permettant l'invalidation du gène codant pour cette protéine.

Nous modulerons la quantité d'insuline dans l'organisme en jouant sur la prise alimentaire (mise à jeun). Des mesures de la sensibilité à l'organisme à répondre après administration par voie orale de glucose et d'insuline permettront de caractériser les différences entre souris mâles et femelles au niveau du métabolisme glucidique et ainsi de détailler finement le fonctionnement du foie en fonction du sexe. Les souris sont élevées au laboratoire dans les conditions optimales appliquées par l'animalerie (température ambiante contrôlée, environnement calme, nourriture et eau en libre-service, habitat enrichi). Les souris seront quotidiennement observées en groupe et individuellement (apparence physique externe, variations de poids, changement de comportement). Des points limites seront établis (douleur, stress) et des dispositions seront prises pour le bien-être de l'animal (utilisation d'analgésiques, raffinement des techniques utilisées). Les fréquences d'intervention sur l'animal seront minimales afin de réduire tout inconfort ou stress.

Nous utiliserons 204 souris pour ce projet, nombre nécessaire et minimal pour l'obtention de résultats valides. De plus, nous utiliserons des souris génétiquement proches (même fond génétique et même âge) permettant de diminuer la variabilité des résultats et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés dans un même groupe d'expérimentation.

L'utilisation de l'animal entier est indispensable puisque nous étudions le rythme circadien qui nécessite le dialogue entre le système nerveux et le foie. De plus, l'étude du métabolisme implique aussi la compréhension des interactions entre foie et tissus gras. Tout ceci ne permettant pas de remplacer le modèle vivant par un modèle alternatif. Le choix de l'espèce est la souris car il n'existe que ce modèle pour la délétion de notre gène d'intérêt.

Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre la physiologie du foie dans son ensemble, mais aussi de déterminer s'il existe des différences en fonction du sexe. Cela pourrait amener à reconsidérer différemment le développement de pathologies (obésité, diabète.) et également le développement des stratégies thérapeutiques.

**9107** La protéine sur laquelle nous travaillons limite la croissance tumorale. Nous pensons qu'activer cette protéine pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour bloquer le développement tumoral. Des chimistes ont produit des nouveaux composés capables d'activer notre protéine d'intérêt. Dans un précédent projet, nous avons sélectionné un de ces composés et montré que celui-ci présente des activités anti-tumorales. Dans ce projet, nous souhaitons associer notre composé d'intérêt avec des thérapies utilisées actuellement dans le cancer dans le but d'induire une régression tumorale efficace. Nous utiliserons des souris commerciales qui possèdent un système immunitaire fonctionnel. Nous injecterons des cellules tumorales de souris en sous cutané dans un seul flanc, ce qui permet de suivre facilement la croissance tumorale. Cette procédure n'est pas douloureuse pour l'animal. Une fois l'injection réalisée, le comportement des animaux sera suivi quotidiennement de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçu pour respecter la règle des 3R.

**REDUCTION :** Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés. Le nombre d'animaux utilisés lors des expériences a été calculé pour utiliser le minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs. Nos précédents résultats *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'absence de toxicité de notre composé sur les animaux.

**RAFFINEMENT** : Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée, pour limiter cette douleur, nous avons établi une grille d'observation visant à définir les points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et qui indiquent les mesures que nous prendrons à l'apparition des premiers signes de la douleur. Toutes ces mesures seront prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation. **REMPACEMENT** : Seul les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires, en particulier les relations complexes entre le système immunitaire et les tumeurs. Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal. Dans ce cadre la souris est utilisée.

Nous testerons 3 combinaisons thérapeutiques sur plusieurs modèles tumoraux. Pour cela nous aurons besoin au maximum de 1152 animaux.

**9108** Chaque année, en France environ 1 500 personnes deviennent para ou tétraplégiques suite à un traumatisme de la moelle épinière (ME). La recherche sur les lésions de la moelle épinière est une priorité aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne (1960 ; 2002). Une lésion traumatique de la moelle épinière déclenche une cascade d'événements qui conduit dans la grande majorité à une perte de fonction motrice plus ou moins irréversible, en fonction du type de lésion et de la formation d'une zone cicatricielle. La cicatrisation spontanée du tissu neuronal ne conduit généralement pas à un résultat fonctionnel. Il est freiné par des phénomènes physiques et chimiques générés au niveau de la lésion. Des biomatériaux innovants sont en développement, pour favoriser une cicatrisation médullaire fonctionnelle et efficace. Il n'est pas possible d'évaluer in vitro l'efficacité clinique de la cicatrisation de la moelle épinière, de la reprise de fonction des organes et des membres d'un être vivant après une lésion médullaire. C'est pourquoi nous devons faire appel à un modèle animal. Les biomatériaux auxquels nous nous intéressons ont déjà été testés chez le rat. Cependant, si ce modèle a donné des renseignements intéressants sur la reprise fonctionnelle, une appréciation plus fine est nécessaire, sur un modèle permettant d'évaluer plus précisément les performances cliniques des biomatériaux, avant qu'il soit implanté chez l'Homme. Nous devons donc utiliser le chien, chez qui l'évaluation clinique de la marche est aisée et qui possède un système nerveux plus proche de l'homme que celui du rat.

Ces études vont nécessiter 15 animaux, ce qui équivaut au nombre minimum d'animaux indispensable pour obtenir des résultats significatifs. Les chiens seront maintenus dans un environnement médical adapté, en tenant compte de tous les effets délétères que les lésions médullaires entraînent. La douleur et l'inconfort sont systématiquement traités voire prévenus (analgésie adaptée). Une équipe spécialement formée prodiguera donc des soins intensifs individualisés (rééducation fonctionnelle, physiothérapie), mais fournira aussi un environnement social aux chiens pour qu'ils restent ensemble, et avec un contact positif avec leurs soigneurs. Des périodes de récréation quotidienne leur sont proposées en groupes sociaux.

**9109** Le métabolisme cellulaire, c'est à dire la façon de se nourrir des cellules tumorales, et le réseau sanguin des tumeurs sont fondamentalement différents de ceux observés dans les organes sains. En effet, lorsque les cellules tumorales se divisent, oxygène et nutriments viennent rapidement à manquer, tandis que des déchets toxiques sont produits en grande quantité. Les tumeurs provoquent alors la création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse). Ce phénomène a amené le développement de traitements, dits anti-angiogéniques, ayant pour but de détruire le système vasculaire tumoral et ainsi d'asphyxier et d'affamer la tumeur. Malgré les grands espoirs suscités par ces approches, certaines cellules cancéreuses sont capables de s'adapter à cette destruction du système vasculaire en modifiant leur métabolisme. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements anti-angiogéniques, notre étude a pour objectif :

(1) d'étudier chez la souris la relation dynamique qui lie au sein des tumeurs le réseau vasculaire et le métabolisme au cours de la croissance tumorale et au cours de la réponse à un traitement anti-angiogénique,

(2) d'étudier l'effet d'un traitement anti-métabolique seul ou combiné avec l'approche anti-angiogénique,

(3) d'étudier la cardiotoxicité induite par ces traitements par imagerie échographique.



Cette étude ne pouvant se faire qu'in vivo, l'utilisation de modèles murins est nécessaire.

Sous anesthésie générale, pour éviter toute souffrance, nous implanterons des tumeurs aux souris avant d'administrer les traitements. Les souris seront ensuite suivies en imagerie avec des techniques non invasives et non douloureuses, similaires aux techniques utilisées chez l'homme en clinique : imagerie par ultrasons et imagerie nucléaire (TEP scan). Durant les séances d'imagerie, les souris seront anesthésiées pour éviter qu'elles ne bougent. Dans un principe de réduction, chaque souris sera son propre témoin.

720 souris seront nécessaires pour pouvoir tester les molécules thérapeutiques et mener à bien ce projet de 3 ans. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum.

Le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement afin de réduire au maximum les souffrances liées aux procédures. En cas de non récupération de l'animal, une mise à mort anticipée sera pratiquée.

Cette étude devrait permettre : (1) de mieux comprendre comment les cancers adaptent leur réseau vasculaire et leur façon de se nourrir en réponse aux traitements anti-angiogéniques, (2) de définir des marqueurs ou caractéristiques d'imagerie permettant de classer les cancers au moment de leur détection entre tumeurs pouvant répondre favorablement aux traitements et tumeurs résistantes, et (3) de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant le métabolisme tumoral en complément de la destruction du réseau vasculaire.

**9110** La douleur est un problème majeur de santé publique. Une partie importante de la population mondiale souffre de douleurs chroniques, ce qui impacte considérablement la qualité de vie des patients et représente un fardeau économique pour la société. La douleur ne doit pas être considérée comme une entité unique. Il y a en fait plusieurs types de douleurs provenant des différentes parties du corps selon différents mécanismes, ce qui implique différentes stratégies thérapeutiques. Parmi ces douleurs, les douleurs musculo-squelettiques représentent l'une des raisons les plus courantes de consultations médicales dans le monde moderne. Selon un sondage récemment publié par l'INSERM, 93% des français déclarent avoir déjà soufferts de douleurs articulaires chroniques, et un sur deux en souffre au moment de l'enquête. Malheureusement, l'efficacité des médicaments analgésiques actuellement disponibles est décevante, beaucoup d'entre eux étant inefficaces ou avec seulement des effets modestes ou de courte durée.

La principale raison qui limite le développement de médicaments plus efficaces est la mauvaise compréhension de la physiopathologie des douleurs articulaires, et le manque de cibles thérapeutiques spécifiques. La compréhension de la physiopathologie associée aux douleurs articulaires chroniques chez l'homme passe par l'utilisation de modèles animaux relevant d'un point de vue clinique. Ces modèles sont, en effet, des outils extrêmement importants et incontournables qui permettent d'étudier les mécanismes moléculaires de ces douleurs, de comprendre comment elles deviennent chroniques et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques.

Ce projet a pour but d'établir de nouveaux modèles animaux de douleurs articulaires chroniques qui reflètent les observations cliniques faites chez les patients souffrant de différentes pathologies articulaires. La mise au point de ces nouveaux modèles est nécessaire dans la mesure où les modèles utilisés actuellement dans la littérature (monoarthrite au CFA, mono-iodoacétate.) ne sont pas pertinents avec nos observations cliniques. Ce projet fait suite à des expériences réalisées in vitro dans lesquelles nous avons récemment identifié, dans les liquides synoviaux des patients, des lipides capables d'activer les canaux ioniques ASIC. Ces canaux constituent donc des nouvelles cibles dans la douleur articulaire, et il s'agit maintenant de valider leur implication et leur intérêt thérapeutique in vivo.

D'un point de vue pratique, ce projet consiste à injecter dans des articulations de rongeurs (genoux de souris et de rats) soit les lipides précédemment identifiés chez l'homme, soit les liquides synoviaux de patients souffrants de différentes pathologies articulaires. Ces injections sont susceptibles de générer chez les animaux des douleurs articulaires chroniques modérées à sévères qui miment celles ressenties par les patients (hyperalgies/allodynies, douleurs posturales). Le projet est organisé en 2 grandes étapes avec 1) la mise au point de nouveaux modèles puis 2) l'étude conditionnelle du rôle des canaux ASIC (si la première étape a permis de valider un modèle).

Ce projet sera réalisé sur un total de 1170 animaux sur une durée de 5 ans (570 souris et 600 rats) et il est conçu de façon à respecter au maximum la règle des 3 R :

Remplacement => Les expériences in vitro ont été effectuées et il s'agit maintenant de valider in vivo et de façon ciblée les hypothèses scientifiques dans des modèles animaux incontournables en accord avec les observations cliniques. A notre connaissance, il n'existe pas de méthode alternative permettant de répondre à notre problématique.

Réduction => Les différentes procédures du projet ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (nombre minimal pour avoir une pertinence scientifique avec une puissance statistique de 90% et un risque alpha de 0.05) et éviter tout double emploi injustifié.

Raffinement => Les animaux sont élevés en milieu enrichi, ils sont surveillés quotidiennement (fiches individuelles de suivi), des grilles de scores ont été établies pour chaque procédure et une seule articulation sera injectée afin de limiter la souffrance des animaux sans altérer les conclusions scientifiques qui seront issues de ce projet.

A terme, ce projet permettra de mieux comprendre la physiopathologie des douleurs articulaires, en utilisant des modèles animaux appropriés, dans le but d'étudier le rôle des lipides dans le développement des douleurs chroniques, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces douleurs.

**9111** Le LDL-Cholestérol (Low Density Lipoprotein) est un facteur associé aux risques de maladies cardiovasculaires incluant les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Son récepteur (LDL-récepteur) permet l'épuration du cholestérol. La protéine PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9) est capable de se lier au complexe formé par le LDL-Cholestérol et son récepteur agit comme un inhibiteur naturel du récepteur au LDL. Au vu de cette observation, de nombreuses stratégies thérapeutiques (exemple : anticorps monoclonaux et statine) ont été mises en place pour inhiber PCSK9 et/ou baisser le LDL circulant et donc diminuer les taux de cholestérol. Ces anticorps démontrent actuellement une grande efficacité clinique et viennent d'être autorisés sur le marché du médicament. L'objectif de cette étude est de déterminer si une nouvelle molécule dirigée contre PCSK9 induirait une modification du profil lipidique comme le feraient les anticorps monoclonaux ou les statines.

On veut comparer notre molécule d'intérêt (ALT30 - un nouvel inhibiteur de PCSK9) aux traitements hypolipémiants déjà existants. On étudiera comme produit comparatif les statines qui jouent sur la baisse du taux de LDL-cholestérol dans le sang en inhibant la synthèse endogène de cholestérol. Il faut savoir que l'utilisation de statines montre aujourd'hui de nombreux effets secondaires comme l'induction d'un diabète de type 2 ou encore des cas d'intolérance. On utilisera aussi comme comparaison des anticorps anti-PCSK9 qui viennent d'être mis sur le marché. Ils sont très efficaces mais leur prix les rend prohibitifs. Toutes ces raisons indiquent que le développement d'inhibiteurs non biologiques de PCSK9 constitue une priorité pour développer des médicaments efficaces, bien tolérés, avec des effets secondaires minimes et abordables.

On induira chez les souris une hypercholestérolémie par un régime riche en graisses, puis elles seront mises sous traitement avec inhibiteurs de PCSK9 (ALT30), la statine ou le placebo. Nous utiliserons des souris sauvages (WT), des souris PCSK9 -/- et des souris LDLR -/-. Nous utiliserons des souris LDLR -/- avec régime riche en graisse, ces souris sont un très bon modèle pour étudier l'hypercholestérolémie. Nous utiliserons également des souris PCSK9-/- pour deux raisons ; dans un premier temps, ces souris sont décrites comme un parfait modèle d'hypercholestérolémie et répondent très bien aux statines. Dans un deuxième temps, notre molécule ALT30 étant un inhibiteur de PCSK9, nous pourrions ainsi observer d'éventuels effets secondaires liés à une interaction non spécifique avec d'autres molécules de la souris.

La balance dommage/avantage sera ainsi analysée sur différents critères. Pour les dommages, nous pourrions observer ou analyser : une toxicité au niveau du foie des souris, une intolérance, une mortalité. Et au niveau des avantages nous pourrions observer ou analyser : une amélioration du profil lipidique, une diminution des taux de cholestérol sanguin.

L'administration des traitements se fera par injection sous-cutanée (SC) chaque jour pendant deux semaines. Des prélèvements de sang se feront par ponction rétro-orbitale, les souris seront maintenues sous anesthésie inhalée (isoflurane) et sur un plateau chauffant afin de prévenir toute

hypothermie. En cas de signe de souffrance (prostration prolongée, comportement agressif, vocalisations) nous injecterons une dose d'analgésique buprénorphine à 0.1mg/kg. En cas de points limites (décubitus latéral et/ou détresse respiratoire) la souris sera euthanasiée. Les souris seront euthanasiées au terme du point final du projet sous anesthésie générale.

Règle des 3R.

Un maximum de 240 animaux sera utilisé pour cette étude. Pour réduire le nombre d'animaux, les groupes seront constitués d'un nombre minimum d'animaux (5 souris) nécessaires aux analyses statistiques. Uniquement une dose d'ALT30 sera utilisée pour limiter le nombre de groupe.

Pour raffiner notre expérimentation, nous réaliserons l'expérience sur plusieurs temps, un premier lot d'expérimentation de 25-30 souris sera réalisé, si les premiers résultats ne sont pas concluants concernant l'efficacité de l'inhibiteur de PCSK9 (ALT30), la suite de l'expérience ne sera pas réalisée. De plus une seconde dose sera utilisée en complément si les résultats sont concluants.

Pour le remplacement des souris par un autre modèle cela fait suite aux premiers tests qui ont été très concluants concernant l'efficacité d'ALT30 sur des lignées cellulaires. Néanmoins il n'y a actuellement pas de modèle cellulaire pour étudier la complexité de l'effet de cette molécule dans un organisme en conditions normolipémiques et hypercholestérolémiques. Le modèle de souris, avec les lignées WT, PCSK9-/- et LDLR-/-, sont ainsi en adéquation et indispensable au projet.

**9112** Les étudiants de l'école vétérinaire reçoivent un enseignement théorique et pratique de physiologie cardio-vasculaire et respiratoire en première année (Bac+3).

Les travaux pratiques (TP) « hémodynamique » (16 séances par an de septembre à décembre (1 séance / étudiant) ont pour but d'illustrer l'enseignement théorique.

Nous disposons dans notre chenil entre septembre et décembre de chaque année d'au moins 9 jeunes chiens en excellent état de santé âgés de 18 mois à 4 ans. Les chiens sont hébergés en groupe et ont un accès à l'extérieur. Ils sont gardés dans nos locaux au maximum 3 ans avant adoption. Les chiens utilisés ne sont pas spécifiquement achetés et hébergés en chenil pour ce TP. Il s'agit de chiens prévus pour d'autres expérimentations non douloureuses et présents dans le chenil pendant la période d'enseignement.

Un seul chien d'expérimentation est utilisé par séance de TP et un même chien participe au maximum à 2 séances par an espacées d'au moins 15 jours chacune. Cette répartition a été choisie comme un compromis entre l'utilisation de 16 chiens avec une anesthésie chacun et des anesthésies du même chien trop rapprochées dans le temps. L'utilisation d'un chien d'expérimentation permet de réaliser une anesthésie sur un animal parfaitement sain ce qui limite fortement le risque de survenue d'effets indésirables.

Après une première partie consacrée à l'examen clinique du chien vigile par les étudiants (auscultation pulmonaire et cardiaque, température rectale,...), le chien est anesthésié. Le but pédagogique est la compréhension par les étudiants des mécanismes de régulation de la pression artérielle et de l'oxygénation qui sont mis en place suite à un léger déséquilibre tel que celui induit par une anesthésie ou un médicament hypotenseur.

L'anesthésie est identique à celle qui pourrait être pratiquée dans une clinique vétérinaire (médicaments et équipements identiques). Tout au long de l'anesthésie qui dure une heure au maximum, l'animal est directement surveillé par l'enseignant vétérinaire qui prendra toutes les mesures nécessaires au maintien de la bonne santé du chien. Aucune procédure douloureuse n'est réalisée pendant l'anesthésie.

Sur les 5 ans, un maximum de 30 chiens sera utilisé (chaque chien ne participant qu'à 2 années universitaires au maximum). Tous les chiens seront proposés à l'adoption.

**9113** Les encéphalopathies épileptiques du spectre des épilepsies-aphasies sont caractérisées par l'apparition 'acquise', dans l'enfance, de troubles du comportement (e.g. régression autistique), du langage (e.g. aphasie, dyspraxie verbale), et de la cognition après une période de développement apparemment normale. Y sont associées de fréquentes décharges épileptiformes interictales durant le sommeil lent. Nous avons récemment identifié une première et importante cause génétique de ce spectre de pathologies : des mutations et microdélétions du gène GRIN2A, codant pour une sous-

unité des récepteurs glutamate de type NMDA (NMDARs), causent jusqu'à 20% de tous les cas sporadiques et familiaux.

Notre projet vise à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, et à une évaluation des stratégies thérapeutiques précoces. L'identification d'une première et importante cause de ce spectre pathologique permet notamment de revisiter les stratégies thérapeutiques actuelles, d'en évaluer de nouvelles, mieux ciblées, ainsi que de tester des hypothèses physiopathologiques - ceci en utilisant les modèles animaux appropriés.

L'étude de modèles animaux reproduisant tout ou partie des aspects cellulaires, moléculaires ou comportementaux, d'une pathologie humaine d'intérêt, est classique et permet d'appréhender la physiopathologie associée à la maladie correspondante chez l'homme, et d'en proposer de nouvelles voies thérapeutiques potentielles ; elle permet aussi d'apprécier les grands mécanismes physiologiques de développement et de maturation du cerveau chez l'homme.

Ainsi notre projet vise-t-il à étudier deux modèles convergents de ce spectre d'encéphalopathies épileptiques, générés génétiquement (KO) ou spontané, respectivement : d'une part un modèle généré génétiquement par knock-out du gène *Grin2a*, dont les mutations chez l'homme conduisent à ce spectre de pathologies ; et d'autre part un modèle spontané (souris A/J) dans lequel des pointes-ondes continues du sommeil ont été objectivées ; ceci afin de comprendre ou de préciser certains des mécanismes et in fine de proposer et tester des stratégies de détection précoce et d'intervention thérapeutique au cours du développement ou de la maturation du cerveau, afin de normaliser les activités épileptiformes survenant durant le sommeil lent et considérées comme cruciales dans le pronostic et la sévérité de la pathologie considérée.

Au total, le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de l'ensemble du projet pour les trois années prévues sera de 995 animaux.

Cette étude prendra en compte les règles des 3Rs :

Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de substitution in vitro pour les études d'activités corticales de surface (EEG) et profonde (deep LFP) permettant d'apprécier l'existence d'activités anormales possiblement liées au sommeil lent.

Réduction : Les expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux. Pour chaque modèle, des analyses postnatales précoces à différents stades du développement et de la maturation cérébrale seront réalisées à différents niveaux (cellulaire, biochimique, histologique, électrophysiologique, comportemental, thérapeutique), en limitant au maximum le nombre d'animaux nécessaires. Ainsi et dans la mesure du possible, un même animal pourra être utilisé pour plusieurs expériences physiopathologiques. Notamment les enregistrements des vocalisations ultrasoniques permettront d'évaluer la communication vocale, comme cela est classiquement fait dans des modèles animaux génétiques d'autisme (e.g. *Shank3*) ou de troubles du langage (e.g. *Foxp2*, *SrpX2*).

Raffinement : Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des souris gestantes comme de leur progéniture, sera évalué quotidiennement (croissance staturo-pondérale, aspect général, comportement seront notamment observés et pris en compte). Une attention particulière sera portée aux animaux lors des différentes procédures expérimentales et des mesures pour réduire la douleur et la détresse seront mise en place telles que l'utilisation d'anesthésique, de tapis chauffant, la réintroduction des animaux avec leurs congénères.

L'environnement des animaux sera bien entendu enrichi, notamment avec des rouleaux ou des igloos cartonnés et une litière spécifique en cellulose plus absorbante enrichie de mini-rouleaux de papier foisonnant permettant aux femelles de former des nids.

**9114** Les champs radiofréquences (RF) deviennent de plus en plus ubiquitaires. Au-delà des interrogations soulevées par le public, cela justifie de rechercher s'il existe un risque même faible, de telles expositions à faible niveau, répétées ou continues.

Jusqu'à présent, seuls les effets des hautes intensités des champs RF ont été validés et attribués à des effets thermiques. Les changements dans l'adaptation à une température chaude à des champs de faible niveau montrés par Pelletier (2013, 2014) et une stimulation de la thermogénèse montrée par Arendash (2010, 2012) suggèrent qu'une exposition chronique ou répétitive à des RF peut stimuler des processus thermorégulateurs de type « réaction au froid » : une vasoconstriction à une

température ambiante de 31°C et une modification de préférence thermique protègent des pertes énergétiques, et une augmentation de température traduit une activation de la thermogenèse.

L'objectif de ce projet est d'étudier le mécanisme d'interaction du champ radiofréquence sur les effecteurs de la régulation thermique, qui induit ces adaptations chez les rongeurs. Avant et en vue d'identifier le mécanisme biophysique initial d'interaction du rayonnement radiofréquence sur une molécule ou une fonction cible, il faut rechercher les événements biologiques et biochimiques élémentaires et intermédiaires à l'origine de l'effet observé sur la température. Les effecteurs d'une réaction au froid peuvent se situer : 1) au niveau périphérique : récepteurs cutanés au froid et vasoconstriction ; 2) au niveau central : adaptation et régulation thermique par l'hypothalamus via le chiasma pré-optique ; 3) réaction au niveau périphérique : stimulation de la thermogenèse, principalement dans le tissu adipeux brun.

Le principal récepteur au froid connu chez les mammifères, commun à l'homme et aux rongeurs dont la souris, est le récepteur TRPM8. Il sera donc recherché si une interaction directe avec les récepteurs thermiques TRPM8 peut être impliquée dans les effets précédemment observés. L'augmentation de température corporelle étant un effet systémique global, cet effet ne peut pas être observé par des méthodes in vitro, et il n'existe pas de modèle tissulaire partiel qui éviterait de rechercher cet effet in vivo.

Ce projet sera réalisé sur 42 souris C57BL/6JRj. Les animaux seront exposés aux RF avec un signal GSM à 918 MHz, quotidiennement deux fois une heure par jour, durant 7 jours. La température des souris sera enregistrée en temps réel par des capteurs thermiques télémétriques toutes les 5 minutes pendant les 7 jours de la période d'exposition aux RF.

Les souris seront hébergées à 3 par cage pour leur socialisation, des enrichissements des conditions d'hébergement des souris seront mis en place tout au long de l'étude pour assurer leur bien-être : litière, objets de découverte et de jeu (tube cylindrique). A la fin de la période d'exposition, un test de larmoiement sera pratiqué, puis les animaux seront euthanasiés. Pour optimiser l'utilisation des animaux et limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, de nombreux échantillons de tissus seront prélevés pour réaliser des analyses biochimiques et immunohistochimiques.

Comme il n'est pas connu à ce jour de mécanisme cumulatif sous l'action de champs radiofréquences de faible intensité pour expliquer les résultats de Pelletier et Arendash, un jalon de cette étude est de confirmer l'échauffement de la souris décrit par Arendash et col. Il faut s'assurer que ces effets sont reproductibles et robustes, et pas liés à des artefacts d'interaction entre les ondes radiofréquences et les systèmes d'enregistrement électrophysiologique.

Les protocoles expérimentaux limiteront fortement l'intensité et la durée de l'inconfort ou de l'angoisse des souris qui seront utilisées, et permettront de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires, pour obtenir des résultats concluants. Des procédures d'anesthésie et d'euthanasie éviteront toute douleur ou angoisse prolongées.

**9115** Ce projet a pour but d'étudier les mécanismes mis en place lors du développement et du maintien du système cardiovasculaire. Pour cela le traçage génétique des différentes populations cellulaires du cœur et des vaisseaux permettra une meilleure compréhension du développement cardiaque. Une étude temporelle dans certains cas permettra d'évaluer la contribution de certains types cellulaires. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera au total 960 souris.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. De plus, en culture, les cellules ne sont sujettes ni au débit et pression du sang, ni aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et l'homéostasie correcte du cœur.

Les souris utilisées dans ce projet seront élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence

d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur et à agir afin de la réduire. Les observations faites et les actions entreprises seront alors notées dans le registre des animaux.

Ainsi l'ensemble de ces arguments démontre la faisabilité de notre projet.

- 9116** L'obésité est considérée à l'heure actuelle comme une épidémie à l'échelle mondiale. Etant associée à de nombreuses pathologies graves, l'obésité constitue sans conteste l'un des principaux challenges de santé publique du XXI<sup>ème</sup> siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses associée à un déséquilibre qualitatif explique en partie ce phénomène. Notre équipe a récemment montré qu'il existait un système de détection des lipides alimentaires au niveau de la sphère orale et intestinale. Cette sensibilité au gras est dépendante d'une protéine, appelée CD36, qui serait impliquée dans la sélection, la digestion et l'absorption des aliments riches en lipides. Au niveau oral, nos données ont contribué à faire émerger un nouveau concept, l'existence d'une 6<sup>ème</sup> modalité gustative : le « goût du gras ».
- Les travaux récents indiquent qu'il existe une diminution de la détection orale des lipides alimentaires chez la souris et l'Homme obèse. Ce changement s'accompagne d'une altération du comportement alimentaire se traduisant, chez l'animal, par une consommation préférentielle d'aliments riches en graisses quand l'animal est soumis à un choix. Mais il est actuellement toujours difficile de décrire quelle(s) composante(s) de la récompense alimentaire est/sont impliquée(s). Ces composantes sont au nombre de trois : le « liking » constitue le plaisir instantané à consommer l'aliment, le « wanting » est la motivation de l'animal à le consommer et le « learning » est l'association entre la récompense et le contexte.
- L'objectif de ce projet est de comprendre comment l'obésité affecte les trois composantes de la récompense alimentaire.
- En particulier, l'utilisation de techniques indolores est privilégiée afin d'acquérir les paramètres nécessaires au projet
- Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :
- En terme de Remplacement : compte tenu du contexte scientifique (étude du goût) et du contexte expérimental (étude du comportement), le recours au modèle animal est indispensable.
  - En terme de Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum, un nombre total de 30 animaux sera toutefois nécessaire. Ce nombre tient compte de résultats antérieurs d'études comportementales afin d'obtenir suffisamment de données pour avoir des groupes discriminants et de pouvoir réaliser des tests paramétriques après validations des critères requis.
  - En termes de Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec de l'enrichissement (frisottis de carton et buchette de bois à ronger) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. De plus, un nombre restreint de personnes interviendront afin de limiter le stress des animaux. Ce personnel dispose d'une formation adéquate et est compétent pour détecter précocement l'un des points limites définis pour ce projet.

- 9117** L'importance des services écosystémiques rendus par les masses d'eau naturelles conduit à une attente sociétale forte quant au maintien de leur qualité. Ces milieux sont le réceptacle d'un grand nombre de contaminants émis par les activités humaines, dont une source importante et chronique est représentée par les rejets de stations d'épuration (STEP), et particulièrement en molécules dites émergentes dont les impacts sur les milieux récepteurs sont très peu connus. Le projet propose de développer et de déployer une approche pluridisciplinaire afin d'améliorer le diagnostic et le suivi de la qualité chimique des masses d'eau. Il permettra le développement de connaissances sur la contamination des masses d'eau, en lien avec la présence de rejets de STEP et l'identification des effets biologiques associés. De façon originale, le projet propose de coupler des analyses chimiques et biologiques (biomarqueurs) réalisées sur des organismes encagés d'espèces représentatives des hydrosystèmes, à des modèles mathématiques prédictifs d'effet au niveau de la population. Afin de

pouvoir prédire les conséquences des rejets des eaux traitées de STEP sur les populations, une contamination de 6 mois en rivières artificielles à un mélange de substances pharmaceutiques représentatif de l'imprégnation des milieux aquatiques permettra d'établir des modèles mathématiques prédictifs et intégrant notamment les biomarqueurs d'intérêt présélectionnés lors des expérimentations au laboratoire. L'ensemble des connaissances sera transféré aux acteurs de l'eau et au grand public afin de les sensibiliser à la problématique de la contamination de l'eau et la protection des ressources.

L'ensemble des expérimentations est réalisé sur un poisson d'eau douce : l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) du fait de sa large utilisation en analyse du risque environnemental et de sa présence dans les rivières françaises. Le nombre maximum de poissons mis en jeu pour la totalité de l'étude est de 3400.

Au laboratoire, la cinétique de variation d'une batterie de biomarqueurs représentative des grandes fonctions physiologiques susceptibles d'être impactées par 5 substances pharmaceutiques fréquemment retrouvés dans les milieux aquatiques, seules ou en mélanges, sera déterminée. L'impact du mélange sur la population de poisson sera évalué en rivières artificielles après 6 mois de contamination. Sur le terrain, 5 – 10 sites d'intérêt seront sélectionnés et une démarche de biosurveillance active sera entreprise en amont et en aval du site.

En lien avec les 3R, nous nous basons sur des organismes vivants afin de prendre en compte l'intégralité des réponses physiologiques tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir une significativité des résultats (test de puissance). Enfin, dans le cadre du raffinement, les animaux bénéficient d'une eau adaptée en termes de paramètres physico-chimiques et d'une période d'acclimatation suffisamment longue pour limiter le stress dû aux expérimentations. Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU, relative à la protection et le bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, pour le maintien et l'utilisation des animaux en laboratoire.

**9118** La résistance aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracile (5-FU) et la Gemcitabine peut avoir pour origine des cellules particulières du système immunitaire, les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Bien que ces agents thérapeutiques aient la capacité de tuer des MDSC, les MDSC survivantes traitées au 5-FU ou à la gemcitabine vont soutenir l'apparition d'une résistance et la progression tumorale par l'expression de cytokines pro-inflammatoires. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle des acides gras oméga-3 docosahexaénoïque (DHA) et eicosapentaénoïque (EPA) dans le contrôle de l'activation des MDSC dans le cas d'un traitement par 5-FU ou gemcitabine. A partir d'un modèle de transplantation de cellules cancéreuses murines EL4 et LLC chez les souris C57bl/6, nous évaluerons :

1) l'effet de EPA et DHA sur la résistance acquise au 5-FU et à la gemcitabine et 2) le rôle des MDSC dans l'effet de l'EPA et du DHA et les mécanismes moléculaires impliqués. Remplacement : L'utilisation de ce modèle murin de cancer est nécessaire car la progression tumorale est un mécanisme complexe d'interactions entre différents types cellulaires ne pouvant être modélisés in vitro. De plus, les similarités physiologiques et métaboliques entre la souris et l'Homme permettront de transposer les résultats obtenus à la situation des patients atteints de cancer. Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé l'effectif nécessaire par groupe en s'appuyant sur notre expérience antérieure en prenant en compte la variabilité interindividuelle et à l'aide d'un outil statistique permettant d'obtenir un résultat fiable et analysable. L'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses murines permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées. Les souris avec les différentes tumeurs seront alors traitées par les acides gras et/ou les agents anti-cancéreux et la progression tumorale sera analysée. Raffinement : Les souris soumises à cette procédure expérimentale seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. Les souris seront maintenues sans traitement antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur euthanasie. Au total, 120 souris seront utilisées.

**9119** La reproduction sexuée est un processus physiologique indispensable à la survie de toutes les espèces de mammifères. La fabrication de gamètes mâles (spermatozoïdes) et femelles (ovocytes) est directement liée à la reproduction sexuée. L'infertilité est un problème de santé publique majeur qui touche entre 8 et 12% des couples à l'échelle mondiale soit plus de 80 millions de personnes. Les causes génétiques d'infertilité masculine (20% des cas) sont encore mal connues. La majorité des anomalies est liée à des défauts de la spermatogenèse, un événement physiologique majeur qui se produit dans les tubes séminifères du testicule et qui permet de produire des spermatozoïdes. Il peut s'agir d'une absence de production des spermatozoïdes ou des perturbations quantitatives ou qualitatives de la spermatogénèse se manifestant par des perturbations du nombre et/ou de la mobilité et/ou de la morphologie et/ou des aptitudes fonctionnelles des spermatozoïdes. L'identification de gènes jouant un rôle dans la spermatogenèse est principalement basée sur l'étude de modèles animaux, en particulier le modèle de la souris. Chez l'homme une telle identification reste largement inaccessible en raison de la difficulté à avoir accès à des échantillons de tissus à partir d'une gonade mâle et surtout les possibilités de vérification fonctionnelle. L'identification de gènes potentiellement impliqués dans la spermatogenèse doit être améliorée afin d'accroître l'efficacité des tests diagnostiques indispensables à la caractérisation des causes de la stérilité chez les hommes afin de leur proposer un traitement médical ciblé. C'est pourquoi le modèle murin est indispensable (remplacement). Il existe des modèles murins transgéniques présentant une infertilité chez les mâles. Le projet propose d'étudier le rôle des gènes ciblés dans les phénotypes observés. Une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'infertilité masculine est nécessaire pour permettre à long terme d'envisager des solutions pour traiter des patients atteints de stérilité. Les souris transgéniques utilisées présentent outre une infertilité mâle, un phénotype dommageable impliquant le système nerveux central et caractérisé par une ataxie.

Pour produire ces souris, un nombre minimum d'animaux est maintenu en croisement et des géniteurs ne présentant aucun signe clinique délétère sont préférés : ils pourront de ce fait être maintenus plus longtemps. Les animaux d'intérêt seront manipulés au fur et à mesure de leur naissance (réduction du nombre d'animaux). Des groupes avec un nombre minimal d'animaux sont prévus.

Afin de palier au mieux aux effets délétères du phénotype dommageable (raffinement), les animaux fragiles sont repérés dès la naissance et attentivement surveillés à partir du sevrage. Tout retard de croissance entraînera la fourniture d'une alimentation spécifique. Les animaux seront observés régulièrement afin de surveiller les points limites.

Au cours de ce projet 100 animaux présentant un phénotype dommageable seront étudiés sur une période de 5 ans.

**9120** 75% des aliments consommés à l'heure actuelle en France sont issus de l'industrie agroalimentaire. Dans le cadre de leur formation initiale, les étudiants futurs ingénieurs en agroalimentaire doivent donc prendre conscience de la responsabilité qu'ils auront vis-à-vis de la santé publique. L'objectif de cet enseignement est d'apporter les connaissances fondamentales indispensables à la compréhension de la valeur santé des aliments permettant la réalisation de formulation nutritionnelle correcte et éthique de produits destinés à l'alimentation humaine. Dans ce cadre, il est proposé aux élèves ingénieurs de concevoir un projet de recherche en physiologie de la nutrition afin de concrétiser sous forme d'une étude scientifique le lien qui existe entre l'alimentation et la santé.

Les étudiants vont explorer l'impact de 4 régimes alimentaires illustrant les effets positifs ou négatifs de différents aliments et nutriments (fibres, acides gras conjugués, soda et huiles riche en acides gras saturés ou en acides gras insaturés) dans le contexte de l'obésité et de ses complications métaboliques. Chaque année, 90 souris seront utilisées dans le cadre de cette étude soit 450 souris sur 5 ans.

S'agissant d'un projet nécessitant l'utilisation d'animaux vivants, les questions d'éthiques en expérimentation animale et la règle des 3R sont abordées en tant que sujet à part entière. En particulier, l'utilisation de techniques non invasives et indolores est privilégiée afin d'acquérir les paramètres nécessaires au projet.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :



- En termes de Remplacement : La physiologie étant la science qui étudie les fonctions et propriétés des tissus et organes des organismes vivants, il est indispensable de recourir au modèle animal, les mécanismes enseignés n'étant actuellement pas encore reproductibles in vitro ou in silico (prise alimentaire, dépense énergétique.).
- En termes de Réduction : le nombre d'animaux inclus a été réduit au minimum permettant de réaliser des analyses statistiques (n=5/groupe expérimental). Afin de réduire le nombre total d'animaux, l'utilisation de techniques non invasives permet la réutilisation (une fois maximum par animal) pour l'ensemble des étudiants de la promotion.
- En termes de Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec de l'enrichissement (frisottis de carton, buchette de bois à ronger et abri) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. L'ensemble des personnels (enseignants, techniciens et animaliers) intervenant sur les souris dispose d'une formation et d'une qualification adéquate à l'expérimentation animale. Enfin, au cours de ce projet, les étudiants seront formés par les enseignants à la manipulation des animaux et sensibilisés au bien être de l'animal.

**9121** En Europe et dans le monde, l'utilisation de substances chimiques est soumise à diverses directives et règlements (directive produits phytosanitaires, règlements biocides et REACH...). Chaque substance doit faire l'objet d'une demande d'autorisation dans laquelle sont requis des tests d'écotoxicité dont l'objectif est d'évaluer les risques que peuvent avoir les substances chimiques sur l'environnement.

A ce titre le laboratoire d'écotoxicologie doit mettre en place le test de bioaccumulation chez le poisson. Ce test rédigé selon la ligne directrice de l'OCDE 305 est requis (sur autorisation de l'Agence Européenne des Produits Chimiques dans le cadre de REACH) pour les substances potentiellement bioaccumulables, il permet de déterminer la quantité de substance chimique accumulée dans le poisson lors d'une exposition via le milieu aquatique ou via son alimentation : on détermine alors un facteur de bioaccumulation (BCF) propre à la substance d'essai et déterminant pour sa classification réglementaire.

Le test consiste à exposer les poissons (*Danio rerio*) à la substance d'essai pendant une durée définie par la ligne directrice, puis à observer une période de "dépuration" pendant laquelle les poissons ne sont plus exposés à la substance. Pendant toute la durée du test la concentration de la substance est déterminée chez le poisson et dans le milieu d'essai.

En raison d'un grand nombre de variantes indiquées dans la ligne directrice et dépendantes des caractéristiques physico-chimiques de la substance à tester, il est difficile d'indiquer avec précision le nombre d'individus qui sera testé. Néanmoins, la dernière révision de la ligne directrice (octobre 2012) intègre la notion de bien-être animal et a donc conduit les auteurs à réduire le nombre d'individus et de concentrations testées par rapport à l'édition précédente du document : ainsi le protocole tel qu'il est écrit aujourd'hui exige un minimum de 72 poissons pour le test avec exposition via le milieu et 80 via l'alimentation. Un test dit "réduit" avec un nombre d'organisme moindre est envisageable pour certaines substances, il sera privilégié autant que possible.

Pour ce projet qui inclue le développement du test et sa réalisation sur 5 ans (avec une fréquence estimée à 2 par an), nous envisageons d'utiliser un maximum de 2500 individus (environ 1000 pour la partie développement et validation de la maîtrise du test à l'aide d'une substance de référence et 1500 pour les tests officiels)

A la fin des tests, tous les individus survivants et exposés à une substance seront euthanasiés. Dans le cadre des 3 R, nous nous gardons la possibilité de réutiliser les lots témoins pour des essais ultérieurs. En cas de surnombre par rapport à cette prévision, les poissons que nous aurons achetés pourront être utilisés dans le cadre d'un autre projet, ceci afin de réduire le nombre d'individus employés dans ces 2 projets.

L'enrichissement des aquariums n'est pas possible car il faut éviter les interactions avec la substance chimique à tester. Les aquariums de stabulation disposent sur une face extérieure d'un poster d'ornement. Tous les aquariums sont situés dans un laboratoire dédié, au calme; les paramètres environnementaux sont contrôlés.

Un apport adéquat en oxygène aux tissus de l'organisme est essentiel à la survie des mammifères. Cet apport est effectué en synergie par les systèmes respiratoires et cardiovasculaires, qui sont contrôlés et régulés par plusieurs groupes de neurones dans le cerveau. Les mécanismes responsables de ce contrôle central chez l'adulte ne sont pas encore bien identifiés, notamment en ce qui concerne la genèse du rythme respiratoire, et le couplage entre neurones contrôlant l'activité respiratoire et neurones régulant l'activité cardiovasculaire pour la mise en synergie des deux fonctions physiologiques. Dans ce projet de recherche, nous souhaitons investiguer ces mécanismes, qui sont d'une importance cruciale tant d'un point de vue fondamental que clinique, l'altération de ces mécanismes conduisant à des pathologies mortelles (hypertension, insuffisance cardiaque.).

Ces mécanismes ne sont toujours pas identifiés notamment car l'activité des cellules impliquées n'a encore jamais été enregistrée dans des conditions totalement physiologiques, c'est-à-dire chez l'animal conscient, non-anesthésié et non-restreint. Nous effectuerons ce type d'enregistrement grâce à l'utilisation d'une technique récemment développée, permettant d'imager l'activité de cellules cibles par fluorescence chez des animaux vivants, sans douleur, et sans altérer leur liberté de mouvements. Une fois les mécanismes identifiés, nous en approfondirons la compréhension en utilisant une seconde approche, plus invasive car sur une préparation réduite qui nécessite le sacrifice de l'animal.

Ces deux approches expérimentales nécessiteront l'utilisation de chirurgies, afin d'induire l'expression de protéines dans des cellules cibles pour pouvoir ensuite enregistrer ou modifier leur activité, et de mettre en place le support pour l'imagerie de ces cellules. Ces chirurgies seront effectuées sous anesthésie générale, utilisant les méthodologies les plus avancées pour réduire au maximum toute souffrance ou inconfort des animaux. Le porteur de projet possède une expérience très approfondie de ce type de chirurgie, acquise dans différents laboratoires internationaux aux critères éthiques très rigoureux.

Nous utiliserons principalement des souris adultes, mâles et femelles (maximum utilisé : 484 souris). L'avantage principal de ce modèle animal est la grande variété de souris transgéniques existantes, permettant l'étude de pathologies génétiques et une grande précision dans le ciblage des cellules étudiées. Nous utiliserons aussi des rats adultes, mâles et femelle (maximum utilisé : 112 rats), afin d'étendre notre analyse à un autre modèle d'étude qui présente des avantages par rapport à la souris notamment en termes d'analyses comportementale et de robustesse physiologique des fonctions cardiorespiratoires.

Ces différentes stratégies expérimentales nous permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés pour servir les objectifs scientifiques de cette étude en utilisant les outils, approches techniques et modèles murins les plus appropriés à chaque partie de l'étude.

Ce projet cherche à découvrir les mécanismes de genèse du rythme respiratoire et de couplage entre neurones respiratoires et cardiovasculaires. Pour l'instant, l'état des connaissances sur le sujet, très modeste, ne permet pas d'envisager d'approches autres que l'expérimentation animale pour répondre à ces questions (comme une étude *in silico* par exemple). Les objectifs de ce projet visent à la fois la compréhension de mécanismes physiologiques et pathologiques fondamentaux, qui par essence relèvent d'une absence de connaissance *a priori* sur ces mécanismes et donc une absence de capacité de modélisation à partir de résultats antérieurs. Nous espérons que les données obtenues dans cette étude permettront de proposer de nouveaux concepts sur lesquels fonder des études *in silico*.

Ce projet de recherche s'inscrit dans les principes de réduction (1) et de raffinement (2) des règles éthiques sur l'expérimentation animale.

(1) L'utilisation de techniques de pointes, encore jamais utilisées pour l'étude du contrôle central cardiorespiratoire, garantie des avancées majeures et indispensables sur la physiopathologie de ces systèmes. L'aspect pionnier de la technique d'enregistrement des activités cellulaires chez l'animal conscient, non-restreint et non-anesthésié (pas de douleur) nous permettra de défricher de nombreuses questions avec plusieurs protocoles expérimentaux non-invasifs chez les mêmes animaux. Cela sert le double objectif d'optimisation des aspects scientifiques et éthiques. Egalement, la variabilité interindividuelle sera réduite par l'utilisation de souches murines fixées génétiquement. Enfin, une analyse de puissance statistique sera réalisée systématiquement avant chaque expérimentation afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à la question

expérimentale. Une fois les expérimentations réalisées, des tests statistiques appropriés permettront de valider ou non la question initiale posée.

(2) Les animaux sont hébergés dans une animalerie conventionnelle, dans des cages avec environnement enrichi et au nombre limite d'animaux par cage respecté, avec accès à l'eau et la nourriture ad libitum, dans des pièces thermo-contrôlées et au cycle jour/nuit en 12h/12h. Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales induisant de la douleur, ici des approches chirurgicales. Cette anesthésie, sous forme gazeuse (isoflurane), suit les protocoles standards (induction à 3-4% d'isoflurane puis maintien à la MAC95), et sera accompagnée d'une analgésie et d'un suivi post-opératoires appropriés (notamment utilisation d'une fiche de suivi individuelle). Le porteur du projet possède une grande expérience dans ce domaine.

**9123** Les leucodystrophies représentent un groupe hétérogène de maladies génétiques touchant primitivement la substance blanche du système nerveux central (SNC) et son principal constituant, la myéline. Parmi elles, le syndrome CACH /VWM est caractérisé par (i) une dégradation neurologique survenant entre 2 et 5 ans exacerbée par des épisodes de stress (infections virales ou traumatismes crâniens) aboutissant au décès en 2 à 5 ans, (ii) un aspect œdémateux et cavitaire de l'ensemble de la substance blanche cérébrale (Vanishing white matter, VWM). Les examens euro-pathologiques mettent en évidence des anomalies des cellules gliales : hypomyélinisation contrastant avec une prolifération des oligodendrocytes immatures et paucité des astrocytes. Des mutations dans les 5 gènes codant les sous-unités d'un facteur d'initiation de la traduction protéique, ubiquitaire, EIF2B (eukaryotic initiation factor 2B) ont été mises en évidence dans le syndrome CACH comme dans des formes plus modérées ou congénitales de leucodystrophies avec aspect de VWM. Il n'existe pour le moment aucune approche thérapeutique permettant d'empêcher ou de retarder le développement de la maladie et son issue fatale en quelques jours ou années.

Dans le cas des maladies du SNC il est impossible d'obtenir des prélèvements du tissu atteint avant le décès du patient. Les seules informations concernant l'évolution de la maladie sont obtenues par des méthodes d'imagerie in vivo (IRM) qui ne permettent pas d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires en cause. Dans le syndrome CACH/VWM la question principale est de comprendre comment des mutations d'un facteur ubiquitaire de la traduction peuvent conduire à des anomalies sélectives des cellules gliales. Les études in vitro à partir de fibroblastes de patients atteints associées à celles de cerveaux post mortem suggèrent un trouble de la maturation des cellules gliales. Afin de mieux comprendre in vivo et au cours des différents stades de développement les mécanismes en cause, un modèle animal robuste et fiable est devenu nécessaire. Pour cela notre équipe a développé des souris transgéniques avec inactivation inductible du gène EIF2B5 (cKO EIF2B). Notre choix s'est porté sur l'inactivation du gène eif2b5, car il s'agit du gène le plus fréquemment muté en pathologie humaine. L'inactivation du gène eif2b5 dans l'ensemble de l'organisme étant létale un modèle d'inactivation inductible était indispensable. L'inactivation d'EIF2B5 est ainsi obtenue par traitement des souris au tamoxifène (molécule pharmaceutique activant l'excision du gène) dans des tissus spécifiquement ciblés (souris Cre-Lox).

Ce projet vise à étudier les conséquences de l'inactivation du gène eif2b5 spécifiquement dans les astrocytes ou les oligodendrocytes à différents stades cruciaux du développement de la substance blanche (myélinisation) afin d'en comprendre l'impact en pathologie humaine.

Pour ce projet nous utiliserons un total de 778 souris.

La règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement) a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée de manière continue :

- Réduction, nous utiliserons le moins de souris possibles tout en veillant à obtenir des données statistiques significatives ;

- Raffinement, nous veillerons à optimiser les méthodologies pour éviter tout inconfort / douleur / détresse / angoisse aux animaux. Afin de préserver au mieux le bien être d'animaux, une attention constante sera déployée pour assurer la qualité des conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des souris (période d'acclimatation, soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité de locaux d'expérimentation);

- Remplacement, les études in vitro à partir des cellules gliales ne permettent pas l'examen de fonctions cognitives et motrices complexes. Néanmoins, nous développerons certaines expériences

sur des tranches de tissus qui pourraient permettre d'évaluer morphologiquement ces cellules, diminuant ainsi le nombre des souris dédiées à des études histologiques.

**9124** La douleur est un problème de santé publique qui diminue considérablement la qualité de vie des patients. D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, en revanche, peu concernant le développement de nouveaux analgésiques. Ainsi à l'heure actuelle les opiacés restent le moyen le plus efficace utilisé pour le traitement des douleurs moyennes à sévères. Malheureusement ils sont peu efficaces pour le traitement des douleurs associées à une atteinte nerveuse (douleur neuropathique) et présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement d'une tolérance à leurs effets analgésiques, ce qui conduit inévitablement à une diminution de l'effet du traitement au cours du temps.

CXCL12 est une chimiokine produite par l'organisme qui joue un rôle important dans le développement de la douleur via son récepteur CXCR4. Nous avons récemment développé des molécules capables de bloquer l'action de CXCL12. L'objectif de ce projet est de tester plusieurs de ces molécules chez les rongeurs afin d'étudier le mécanisme d'action de CXCL12 dans la modulation de la douleur et d'évaluer leur potentiel thérapeutique pour le traitement de la douleur.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : les molécules sélectionnées ont été caractérisées au préalable in vitro pour leur activité et leurs caractéristiques physicochimiques. Cependant, l'évaluation de leur effet sur la nociception n'est réalisable aujourd'hui que sur l'animal entier.

Réduire : Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe, ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans une animalerie dont le fonctionnement est conçu pour maximiser leur confort et limiter leur souffrance. En particulier, les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi, et observés quotidiennement par l'expérimentateur ou une personne compétente. Les chirurgies seront toutes effectuées sous anesthésie et analgésie adéquat, et les animaux maintenus au chaud et surveillés jusqu'au réveil complet, avec traitement complémentaire analgésique

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 680 rats Wistar

**9125** 1)

A) But du protocole expérimental sur cobayes.

Production d'anticorps sur cobayes mâles ou femelles après injection d'antigène.

B) Le choix de l'animal s'est fait car le cobaye est un très bon modèle pour ce type de protocole, ce qui permet d'optimiser au mieux la production et d'utiliser un nombre réduit d'animaux.

Cette méthode appliquée sur cobaye est une méthode validée, qui permet de satisfaire aux besoins, avec l'utilisation du nombre le moins élevé d'animaux possibles.

Il n'y a pas de méthode substitutive.

C) Un prélèvement de sang de 1mL est effectué 7 jours après la dernière immunisation ensuite selon le résultat le cobaye est réimmunisé ou prélevé en phase terminale. Les prélèvements se font sous anesthésie.

Nous utiliserons environ 1000 cobayes sur 5 ans.

D) La durée du protocole est de 5 à 6 mois à la fin de ces protocoles les cobayes sont euthanasiés avec un produit adapté.

La durée de la phase de prélèvement est basée sur le temps pendant lequel la quantité d'anticorps récupérés est satisfaisante.

E) Les cobayes sont confinés dans les pièces d'unité animale qui leurs sont dédiés, en ne dépassant pas le nombre d'animaux recommandé, correspondant aux surfaces disponibles et au renouvellement d'air.

F) Les cobayes proviennent d'un élevage agréé pour les laboratoires.

G) Le rôle des personnes impliqués, dans le cas de ces protocoles : expérimentateur, vétérinaire, animalier et responsable de l'état sanitaire des animaux, est bien défini, un contrôle plus important après chaque manipulation est également défini pour les personnes directement concernées. Le soin

des animaux se fait par une personne compétente, avec un contrôle journalier de leur état de santé. Un contrôle plus important après chaque manipulation est également défini pour les personnes directement concernés.

H) Les douleurs pendant l'injection de l'antigène sont des douleurs légères. Afin d'éviter toute souffrance, les cobayes sont toujours euthanasiés sous anesthésie gazeuse profonde à l'isoflurane.

**9126** L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, causé par un infarctus (accident dit ischémique) ou une hémorragie (accident dit hémorragique) au niveau du cerveau, empêchant un apport sanguin suffisant vers ce dernier. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale, comme l'IRM (technique de choix). Le traitement le plus récent et le plus prometteur de l'accident ischémique semble être la thrombectomie, visant à détruire le caillot responsable de l'occlusion et ainsi restaurer l'apport sanguin (perfusion) du cerveau. Mais cette reperfusion, bien que bénéfique, entraîne également des lésions supplémentaires aux cellules. Le traitement des lésions de reperfusion est donc crucial car il réduit les lésions cellulaires et l'inflammation.

La majorité des essais cliniques a échoué au moment de la translation clinique en raison des trop grandes différences entre le modèle rongeur de l'AVC et la réalité clinique. Le modèle primate est donc un modèle de choix pour ces études. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiopathologiques chez l'Homme en réponse à un AVC.

Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit de mettre en place un modèle d'AVC ischémique avec caractérisation par imagerie IRM-TEP chez le macaque afin d'évaluer l'efficacité d'une molécule d'intérêt ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de l'infarctus du myocarde. Ce projet prévoit au maximum 60 animaux qui proviendront d'un élevage agréé ; c'est le nombre nécessaire pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par un neuroradiologue interventionnel expérimenté. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC.), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

**9127** Notre projet porte sur les représentations neuronales de la mémoire du temps et de l'espace. Ce projet de recherche fondamentale est d'une durée de 5 ans. A moyen et long terme, ces expériences ont des applications cliniques pour des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, mais aussi la maladie de Parkinson. Ces dernières années, des travaux ont documenté le rôle d'une structure clé dans la représentation de l'espace et du temps : l'hippocampe. Cette structure présente 1) des cellules dont le taux de décharge représente la position de l'animal dans l'espace, et 2) des cellules dont le taux de décharge représente des moments discrets lors du passage du temps. La présence de ces cellules a permis de poser l'hypothèse selon laquelle l'hippocampe permet d'encoder les événements dans le temps et l'espace donnant un support à la mémoire dite épisodique. Notre projet étend la portée de ces travaux en déplaçant notre intérêt sur les structures connexes à l'hippocampe telle que le striatum et les cortex cingulaire postérieur et rétrosplénial. Nous allons réaliser des

enregistrements électrophysiologiques pour comprendre le rôle de ces structures connexes qui sont elles aussi touchées dans les pathologies neuro-psychiatriques.

L'espèce utilisée, le macaque Rhésus, possède des capacités cognitives proches de l'homme, lui permettant de résoudre des opérations logiques remarquablement similaires à celles de l'homme. De plus, le système visuel du macaque est très similaire à celui de l'homme : contrairement au rongeur, il dispose d'une vision fovéale, de la perception des couleurs, la stéréoscopie, le contrôle oculomoteur. Alors que l'hippocampe est une aire cérébrale philo-génétiquement ancienne, certaines des aires cérébrales que nous explorerons dans le projet, tel que le cortex cingulaire postérieur, dédiées à la gestion de l'espace visuel en coordonnées rétiniennes, ou centrées sur la tête ou le corps, n'ont pas d'équivalent chez le rongeur. Du fait de cette homologie avec l'homme, le macaque rhésus est le modèle expérimental de choix. L'ensemble des expériences que nous menons portent directement sur les processus neuronaux, de fait, sont inaccessibles par des expérimentations chez l'homme via l'IRM. Ainsi, notre modèle primate n'est pas remplaçable.

Nous utiliserons 8 singes (macaque rhésus). Quatre seront équipés d'une chambre d'enregistrement permettant des enregistrements aigus après une localisation anatomique par imagerie. Des enregistrements quotidiens seront effectués chez ces singes dans des conditions qui permettent d'observer leur regard et de mesurer leur perception du temps (n=2) et de l'espace (n=2) dans un laboratoire. Les 4 singes suivants seront équipés d'électrodes chroniques et les enregistrements seront réalisés alors que les singes se déplacent dans l'environnement réel. Ainsi les deux protocoles permettront d'appréhender des problèmes scientifiques identiques sous des angles différents. En particulier, les expériences en environnement réel, seront celles qui se rapprochent le plus des conditions écologiques puisque nous étudierons la représentation de l'espace chez le singe qui se déplace seul ou en présence d'un congénère.

Ce projet est d'une durée totale de cinq ans mais chaque singe ne sera utilisé en expérience que pour une durée totale de 2 ans environ.

Le nombre de singe est de 2 chacun pour les groupes concernant les bases neuronales du temps et de l'espace testés en laboratoire ce qui permet normalement d'atteindre une puissance statistique suffisante pour que les résultats scientifiques qui découlent du projet soient valides. Pour les animaux testés en volière avec déplacement libres, nous testerons les effets du partage de l'espace avec un congénère, c'est pourquoi nous planifions d'utiliser deux couples de singes plutôt que deux singes seulement. Pour tous les groupes, nous utiliserons des électrodes à contacts multiples qui permettent d'augmenter le rendement des enregistrements, et ainsi réduire à la fois le nombre de sessions expérimentales pour chaque singe et le nombre de singe. De plus, les techniques utilisées sont maîtrisées au laboratoire, et améliorées dès que nous le pouvons en accord avec le vétérinaire. Ainsi, cette approche nous permet de prendre en compte un but de réduction du nombre d'animaux.

Les techniques que nous utilisons permettent de mettre en œuvre un certain nombre d'éléments de raffinement. Les techniques d'enregistrement avec des électrodes laminaires correspondent à un raffinement qui permet de réduire considérablement le nombre de jours pendant lesquels l'animal est en protocole. Les expériences en volière permettent de substituer aux conditions de test en laboratoire, des conditions de tests sans contrainte physique. Enfin, nous utiliserons des IRM anatomiques qui nous permettront d'envisager de ne pas sacrifier les animaux à l'issue de l'expérience.

Les animaux seront soumis à une craniotomie et la pose d'implant pour effectuer les enregistrements neuronaux. Ces procédures qui sont faites sous anesthésie générale, suivies des enregistrements, conduisent à être classées comme modérées. Toutefois, à l'issue des expériences, les implants seront retirés, et il n'y aura que peu de séquelles des procédures hormis la craniotomie sous la peau et une cicatrice. Nous essaierons de placer les animaux en sanctuaire à l'issue des expériences.

**9128** Les maladies métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à une accumulation excessive de lipides dans le foie et à une dyslipidémie systémique provoquant des complications vasculaires. Cette accumulation anormale de lipides intra-hépatique va induire un stress inflammatoire provoquant le développement d'une fibrose hépatique. Cette fibrose va alors provoquer un dérèglement des fonctions hépatiques allant de la cirrhose au cancer du foie. La dyslipidémie systémique est fortement liée à l'insuffisance hépatique et est impliquée dans le

développement des complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie) et macrovasculaires (athérosclérose, macro-angiopathie). Il est bien établi aujourd'hui que les macrophages tissulaires et les monocytes circulants jouent un rôle important dans la mise en place de cette fibrose, de la dyslipidémie et des complications vasculaires dans le diabète de type-2. Cependant les acteurs moléculaires sont moins bien connus. Récemment nous avons identifié deux protéines IRF5 (Interferon Regulatory Factor 5) et Elovl 2 (Fatty Acid Elongase 2) comme des modulateurs de l'activation des macrophages dans le contexte du diabète et de l'obésité. Leurs rôles dans l'inflammation hépatique et dans l'activation des monocytes circulants restent cependant énigmatiques. Dans ce projet, nous souhaitons démontrer le rôle de ces 2 protéines dans les processus cellulaires impliqués dans le développement des comorbidités hépatiques et complications vasculaires du diabète de type-2. Pour ceci, nous allons appliquer différents modèles connus pour induire une stéatohépatite (régimes, traitement pharmacologique et chirurgie) dans les souris WT et les souris Elovl2 et IRF5 invalidées spécifiquement dans les macrophages. Des données préliminaires (non-publiées) chez l'homme démontrent une dérégulation de l'action d'Elovl2 et IRF5, confortant fortement notre hypothèse de travail.

La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée, par exemple, pour les études cellulaires, nous allons remplacer les modèles murins par l'utilisation des lignées cellulaires, les mêmes souris seront utiliser pour plusieurs projets d'équipe afin de réduire le nombre total des souris sous expérimentation. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux.

Nombre d'animaux utilisés : 240 souris (20 souris par groupe et par conditions expérimentales)

Protocole expérimental : étude du phénotype métabolique, inflammatoire des souris invalidées pour IRF5 et Elovl2 spécifiquement au niveau des macrophages et monocytes (IRF5 et Elovl2 MacKO) soumis à un régime normal, un régime riche en graisse et un régime riche en graisse-déficient en choline.

**9129** Certaines molécules rentrant dans la composition des emballages plastiques destinés au contact alimentaire sont capables de migrer depuis l'emballage jusque dans l'aliment. Ces molécules sont donc des contaminants alimentaires dont il est important de connaître les risques liés à une exposition régulière, en particulier lors d'expositions in utero ou juste après la naissance. Le bisphénol A est un exemple de composé rencontré dans les plastiques, et autorisé dans les emballages à contact alimentaire jusqu'en 2015. Son interdiction a conduit les industriels à lui trouver des substituant sans effet nocif sur la santé humaine et animale. Nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données concernant le substituant du BPA que nous nous proposons de tester dans cette étude, or nous savons que certains métabolites issus de la biotransformation du composé parent peuvent se révéler plus toxiques et avec des effets biologiques plus nocifs que la molécule parente.

Le but d'une étude de métabolisme est d'identifier, grâce à un traceur radiomarqué, les différents métabolites après la biotransformation dans l'organisme de la molécule parente et de caractériser une potentielle toxicité des métabolites identifiés. Ces études de métabolisme doivent être réalisées chez l'animal de laboratoire afin de disposer d'un modèle complet avec toutes les influences hormonales, nerveuses et sanguines (qu'il est impossible de considérer sur des modèles in vitro), dans le but de fournir aux instances réglementaires française et européennes, les données nécessaires pour la caractérisation du danger et une meilleure l'évaluation du risque de ces molécules. En revanche, les études de métabolisme ne nécessitent que peu d'animaux (4 par groupe au maximum) : ces études sont descriptives et les variations interindividuelles concernant le métabolisme sont très faibles, ce qui participe à la réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales. Afin d'identifier les différences de métabolisation, cette étude sera réalisée chez des 16 rats (repartis en 4 groupes), ainsi que leurs fœtus et nouveaux nés (4 mâles et 4 femelles par rate gestantes (n=4) ou allaitantes (n=4), soit 64 au total). Un bilan métabolique et une étude de la distribution complète de la molécule choisie et/ou de ses métabolites dans l'organisme sera réalisé. Le temps 24h permet de limiter au maximum la durée de séjour des animaux en cage à métabolisme. Les points limites permettent de prévenir la souffrance et l'angoisse des animaux. Cette étude sera également réalisée chez les fœtus des femelles gestantes et les nouveau-nés de façon à identifier

un passage transplacentaire de la molécule parente et/ou de ses métabolites, et un passage dans le lait chez le nouveau-né. L'identification des métabolites majeurs sera également réalisée (méthodes analytiques et biochimiques).

**9130** **Projet :** La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. Il s'agit d'une pathologie rare qui est fréquemment associée aux maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), principalement la rectocolite hémorragique (RCH) mais également maladie de Crohn. Il est admis que les MICI résultent d'une rupture de l'équilibre entre le microbiote intestinal et le système immunitaire, et il est possible que les mêmes mécanismes interviennent dans la CSP.

L'objectif de notre étude est de déterminer l'impact d'une colite chronique sur les lésions fibro-inflammatoires hépatiques dans un modèle murin transgénique : modèle le mieux établi de CSP. En effet, des données récentes montrent que l'induction d'une colite aiguë améliore l'inflammation et la fibrose hépatique. Nous souhaitons évaluer si l'induction d'une colite chronique a le même effet sur les lésions hépatiques.

Nous évaluerons les conséquences de la colite aiguë ou chronique sur la maladie hépatique. Une telle recherche de causalité ne pouvait être abordée que par l'analyse d'un modèle animal de CSP comme le modèle murin transgénique qui sera utilisé dans le cadre de ce projet.

**Nombre d'animaux :**

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 480 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

**Remplacement :** Un système vivant est nécessaire pour étudier les interactions entre organes. Il n'est pas possible de reconstituer *in vitro* la complexité d'un organisme entier, en particulier pour étudier les interactions entre organes.

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

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

**9131** Les troubles psychiatriques et métaboliques présentent une forte comorbidité, suggérant que leur étiologie dépend de mécanismes physiologiques communs. Ces mécanismes étant encore très mal connus, le but de cette étude est de les disséquer afin de comprendre le lien entre métabolisme et cognition dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. A ces fins, nous nous appuyons sur la découverte récente montrant que l'expression des deux facteurs de transcription Dlx5 et Dlx6 dans les neurones GABAergiques régule le métabolisme et le comportement. L'inactivation ou la surexpression ciblée de Dlx5/6 dans des régions précises du cerveau de souris sera mise en place. Des phénomènes de motivation à recevoir des récompenses, de comportement de préférence de place, de choix alimentaire ou encore de calorimétrie seront analysés au moyen de différents tests. Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement de l'animal. Ce projet utilisera le minimum de souris nécessaire (5 études comportant 3 groupes de 16 souris (8 contrôles et 8 traitées) plus 1 étude comportant 4 groupes de 16 souris (8 contrôles et 8 traitées); soit 304 souris sur les 5 ans de projet) et respectera le bien-être animal. Lors de ces études la règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera



réduit au minimum en remplaçant par des techniques de culture cellulaire et nous raffinerons les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Nous effectuerons l'administration d'analgésique lors des procédures, de plus, pour poursuivre l'antalgie en post opératoire, un anti-inflammatoire sera injecté le jour suivant l'opération si nécessaire. Les cages individuelles sont agrémentées d'un nid végétal et quelques croquettes sont mises à même le sol pour éviter les douleurs de tension au niveau de la suture les deux premiers jours après l'opération.

**9132** Un primate non humain sur quatre présente désormais des malformations faciales dans le nord du parc national de Kibale en Ouganda. Leur environnement chimique imprégnant sol, sédiments, maïs frais et poissons, est suspecté d'être une cause majeure de ces déformations. Des résultats préliminaires ont montré la présence de trois insecticides, chlorpyrifos, imidaclopride et 4,4' DDE à des doses excédant celles acceptables. Ce projet vise dans un premier temps à tester les effets perturbateurs thyroïdiens des eaux de rivière déjà prélevées en utilisant des têtards de xénope. Dans un second temps, grâce à l'analyse chimique d'échantillonneurs d'eau passifs (POCIS) placés dans deux rivières de nouvelles substances seront identifiées. Ces substances mises en évidence par les POCIS seront mises en solution dans une eau standard et testées pour leur effet perturbateur thyroïdien. Nous comparerons ces effets à ceux observés dans la première phase du projet. Nos objectifs sont l'étude du mode d'action des pesticides potentiellement à l'origine des malformations des primates non humains, la validation de méthodes de surveillance de la pollution environnementale et la mise en œuvre des mesures auprès des agricultures afin de réduire les risques d'exposition pour la faune et les hommes.

La présente demande concerne les expériences sur les têtards de xénope en laboratoire. En effet les prélèvements faits sur les primates non humains sont non invasifs (récupération des excréments) et ne nécessitent pas de demandes éthiques spécifiques. Nous possédons d'ores et déjà quatre prélèvements provenant de trois eaux de rivière et d'un marécage provenant de la région de Kibale que nous testerons avec et sans adjonction d'hormones thyroïdiennes. Un blanc avec l'eau d'Evian classiquement utilisée en écotoxicologie sera également ajouté. Nous effectuerons trois tests pour affiner le mode d'action 1) la lecture de la fluorescence 2) la quantification de l'expression des gènes dans le cerveau des têtards 3) le suivi de leur comportement de nage suite à une stimulation par de la lumière. Pour chacun des tests et pour chacun des groupes par test nous utiliserons 15 têtards (chaque test sera fait en triplicat). Ceci revient donc à l'utilisation de  $15 \times 5 \times 2 \times 3 \times 3 = 1350$  têtards.

De plus, après avoir obtenu les résultats de l'identification de pesticides retrouvés à partir des échantillonneurs passifs (POCIS\_ voir description du projet), le mélange sera testé seulement sur les têtards « fluorescents ». Nous ajouterons donc  $15 \times 5 \times 2 \times 3 = 450$  têtards.

Un total de 1800 têtards de quatre jours post fécondation sera donc utile à la réalisation de la partie "recherche du mode d'action perturbation thyroïdienne" du projet. Ces têtards de quatre jours post fécondation font 0,5 cm de long et seront placés dans les eaux de rivière pendant 3 jours avant l'une ou l'autre des mesures détaillées ci-dessus. Etant donné que l'ensemble des têtards nécessaires aux expériences seront obtenus au laboratoire, nous utiliserons également 9 femelles adultes de type sauvage (les têtards fluorescents seront obtenus grâce à un croisement avec un mâle transgénique). Un nombre total de 1809 animaux sera nécessaire pour l'ensemble du projet.

Avantages et dommages escomptés de ce test : L'utilisation de larves de xénope est plus avantageuse que l'ensemble des tests in vitro existants. Il existe une douzaine de tests sur cellules qui permettent d'étudier une partie de l'axe hormonal thyroïdien (de la synthèse dans la glande à l'action dans la cellule) mais aucun ne peut prendre en compte la circulation sanguine, la métabolisation par le foie et le rétrocontrôle que le cerveau exerce sur la production d'hormones par la thyroïde. L'utilisation d'un animal est donc requise. Le xénope est un vertébré qui a un développement embryonnaire externe. L'ensemble des produits peut être appliqué par baignade et non par injection ou gavage.

les animaux sont anesthésiés avant l'observation et la prise de photo. Si le têtard a une forme ou une taille de tête anormale, nous ne considérons pas le têtard pour les mesures et ils sont immédiatement euthanasiés.

**9133** Les dispositifs médicaux constituent un élément clé à la fois dans le domaine diagnostique et dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, ils incarnent des produits ingénieux dont la recherche et le développement s'avèrent désormais indispensables pour satisfaire l'ensemble des besoins de santé. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables comme des allergies, des irritations, voire des réactions généralisées de l'organisme.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordial pour y parvenir intégralement. En effet, si des méthodes alternatives existent, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur complexité chimique.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (cobayes, souris, hamsters) et de lapins. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes de référence. L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 36 100 cobayes, 30 100 souris, 4 300 lapins et 200 hamsters.

Par ailleurs, lorsque les interventions seront susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures seront envisagées (anesthésiques, analgésiques,...). De plus, tous les animaux jouiront d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des procédures. Enfin, les animaux grégaires seront hébergés en groupes dès que l'essai le permet; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères seront maintenus dans tous les cas ; des chaînettes sont suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes sont disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent; des objets en bois sont aussi distribués aux lapins et cobayes afin de favoriser l'activité d'exploration et de mastication; des objets de nidification ou des objets en bois sont aussi distribués aux souris et hamsters. Enfin, de la musique sera diffusée dans les salles d'hébergement pour apaiser les animaux.

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

**9134** Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques ou hypocaloriques, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation.

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

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

2. Réduction : l'étude portera sur des souris mâles de laboratoire, réparties en 5 groupes d'études selon leur régime alimentaire : riche en graisses, riche en sucres, normal, pauvre en calorie et jeûne. Chaque groupe sera subdivisé en deux sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS, ou sulfate de dextran sodique). Ainsi, 100 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques.

**9135** Dans un contexte sociétal et économique où l'avenir des productions animales est questionné, un des défis actuels est de garantir la durabilité des systèmes de production tout en assurant le bien-être animal. La France est un des leaders pour la production porcine mondiale. Parmi les critères importants pour répondre au mieux aux enjeux liés à la sécurité et la qualité des produits, les qualités maternelles représentent un objectif majeur. Ces dernières correspondent à l'ensemble des caractéristiques qui influencent la survie et la croissance des porcelets d'une truie. Les efforts menés ces dernières années ont abouti à la production de truies de plus en plus prolifiques. Cette prolificité accrue s'est en revanche accompagnée d'une augmentation de la mortalité des porcelets avant sevrage. Ces pertes sont donc un frein à la durabilité du système de production porcine et dégradent un peu plus l'image d'ores et déjà abîmée de l'élevage français.

Ainsi, l'objectif de notre projet est de contribuer à mieux comprendre le déterminisme génétique des aptitudes maternelles dans l'espèce porcine afin d'identifier un/des leviers permettant d'améliorer la survie des porcelets à la naissance. Pour ce faire, un groupe de 1500 porcelets et 500 parents est inclus dans ce projet soit un total de 2000 individus. Le projet cible la période critique des 24 premières heures après la naissance, période durant laquelle la mortalité est la plus importante. Au sein de chaque portée, un prélèvement sanguin sera effectué sur 3 porcelets (le plus léger, le plus lourd et le poids moyen). Ces prélèvements, estimés comme de sévérité « légère », seront réalisés par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité. Les animaux seront mesurés pour des caractères de routine comme leur poids, leur vitalité, leur taille. Les animaux seront ensuite suivis jusqu'à l'abattage pour des caractères de production. Ce projet a été réfléchi dans le cadre du respect de la règle des 3R :

- Remplacer ; le porc étant l'espèce cible du projet avec comme finalité la diminution de la mortalité des porcelets, il n'est pas envisageable de « remplacer » cette espèce par une autre. En revanche, les résultats obtenus pourront être transférés à d'autres espèces, comme le lapin, pour lesquelles le poids de naissance et/ou le poids au sevrage sont également des critères de production.

- Réduire ; d'une part se focaliser sur les individus aux phénotypes extrêmes et un individu contrôle, plutôt que sur la portée totale, est déjà un moyen de réduire le nombre d'individus à considérer. D'autre part, les effectifs importants reposent sur la complexité des caractères considérés, ils ont été préalablement évalués par une analyse statistique adaptée.

- Raffiner ; les mesures phénotypiques sont des mesures d'ores et déjà effectuées en routine dans les élevages donc les protocoles sont en place et bien maîtrisés pour limiter le stress des animaux. Par ailleurs, les prélèvements sanguins seront effectués par du personnel habilité. Une attention particulière sera apportée aux animaux les plus légers donc les plus fragiles en prélevant un volume sanguin moindre.

**9136** Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Le dépistage permet de déceler d'éventuelles anomalies très tôt augmentant ainsi grandement l'efficacité des traitements et les chances de guérison. En revanche ces chances diminuent en cas de diagnostics tardifs, en particulier dans le cas des tumeurs invasives avec atteinte ganglionnaire et présence de tumeurs secondaires (dites métastases). Il est difficile de suivre directement l'invasion tumorale in vivo, et à

ce jour il n'y a pas encore une image claire des différents mécanismes responsables de ce processus. Comprendre les acteurs requis à l'invasion est ainsi essentiel dans la lutte contre le cancer.

Il a été développé différents systèmes d'analyse in cellulo permettant d'évaluer les capacités invasives des cellules tumorales dans différentes conditions et dans différentes matrices mimant les tissus environnementaux présents dans la glande mammaire. Cependant la complexité des processus mis en jeu in vivo ne peut pas être reproduite dans des systèmes reconstitués in vitro. En effet la glande mammaire adulte est formée d'un réseau épithélial de canaux ramifiés et d'alvéoles sécrétrices inséré dans un stroma fibro-adipeux complexe sous contrôle hormonal. C'est pourquoi il est indispensable de valider les conclusions basées sur l'observation des cellules tumorales en culture en utilisant des modèles animaux. Le programme invasif des cancers du sein peut être ainsi reproduit chez la souris dans des conditions similaires lors de l'évolution d'une tumeur chez la femme. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et pouvoir suivre la progression de l'invasion tumorale au cours du temps nous développons une technique chirurgicale de pose de fenêtre d'observation au niveau des glandes mammaires étudiées. Ainsi une même transplantation pourra être analysée plusieurs fois au cours du temps sur un même animal. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est évalué à 500. De plus lorsque les animaux seront sacrifiés à la fin des expérimentations, les glandes mammaires sont prélevées, fixées et sont soit conservées en paraffine soit marquées par immunofluorescence pour pouvoir réaliser des analyses complémentaires des tissus. Toutes les précautions seront donc prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en s'assurant de pouvoir conclure sur les résultats obtenus ainsi que pour limiter la souffrance et le stress des animaux (anesthésie, soins opératoires et post opératoires, suivi particulier des animaux opérés à l'animalerie...). Puisqu'il s'agit d'étudier les étapes précoces de l'invasion tumorale, les expériences sont arrêtées avant la souffrance des animaux, car avant apparition d'une tumeur primaire importante. Ce projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution de la tumeur du sein tant au niveau cellulaire que du microenvironnement. Ce qui permet d'obtenir des données pouvant être utilisées pour le diagnostic précoce et améliorer les traitements existants dans les cancers du sein.

**9137** Une inflammation soutenue est un facteur de risque accrue à l'apparition de carcinome hépatocellulaire (CHC). S'il existe bien des cellules qui agissent contre le développement des cellules cancéreuses, Il a également été montré que des cytokines et des chimiokines sécrétées par des cellules cancéreuses favorisent le recrutement des cellules immunitaires et inflammatoires sur le site précancéreux, dans le but de faciliter le développement des cancers. Par ailleurs, des études récentes montrent une contribution clef du microbiote intestinal dans l'apparition d'un environnement hépatique favorable au développement et la progression du CHC. Ainsi, une modification importante de la composition du microbiote intestinale ou « dysbiose » peut entraîner l'apparition d'une inflammation hépatique chronique issue des produits bactériens. À l'heure actuelle, il n'est pas clair si c'est l'inflammation chronique ou des modifications induites par les métabolites bactériens, voir les deux qui sont le facteur dominant de l'hépatocarcinogénèse. Le Triméthylamine-N-oxyde (TMAO) qui est un métabolite dérivé de la dégradation de la choline par le microbiote intestinal, a récemment été impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose notamment par la formation de Foam cell (macrophage dit spumeux chargé en gouttelette de lipides). Le TMAO est capable de modifier le phénotype des macrophages mais également de favoriser la réponse inflammatoire par l'augmentation de l'expression de marqueur ou le recrutement de cellules effectrices à cette réponse. Son rôle dans le CHC reste cependant peu documenté. Toutefois, des données interne nous amène à penser un rôle possible du TMAO dans le développement du CHC. Par ailleurs, le nombre de CHC associé à la maladie métabolique est en augmentation constante. L'apparition de CHC à la suite du développement de la NASH (Non alcoolique stéatose hépatite), est décrite, être relative au développement d'une inflammation hépatique, dont la conséquence serait le développement d'une cirrhose puis d'un CHC. Le TMAO pourrait jouer un rôle de également dans le développement de cette inflammation et favoriser ainsi l'apparition de CHC au cours de la NASH. Nous proposons à partir d'un modèle animal de CHC basé sur l'administration de thioacétamide (TAA), de réaliser l'évaluation du TMAO sur le développement de CHC, mais également à partir d'un modèle murin de NASH basé sur la mise sous régime alimentaire spécifique high fat high carbohydrate suppléé de 1%

de cholestérol (HFHC+1% de cholestérol). Le diagnostic et l'évaluation des lésions tumorales seront effectués par une analyse histologique des lames de foie après lecture par un anatomopathologiste. Cette analyse sera complétée par des dosages de marqueurs de l'inflammation mais aussi une caractérisation du phénotype des macrophages au niveau hépatique. L'apparition de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal engendrera une prise en charge de la douleur, des soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation. En cas de douleur une analgésie pourra être mise en place par l'injection de buprénorphine (0,1 mg/Kg/j) SC et métacam (2 mg/Kg/j) p.o. dans l'eau de boisson. En cas d'atteinte des points limites les animaux seront exclus de l'étude. Une non réponse à la procédure d'analgésie ou de procédure de soin entraînera l'euthanasie de l'animal par gradient de CO<sub>2</sub>. Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre de 148 souris maximum nécessaires à cette étude. Cette étude nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques en vue d'améliorer la performance thérapeutique, chez l'humain.

**9138** La manière dont nous traitons l'incertitude est très importante. Quand on est incertain, le comportement naturel est d'explorer pour mieux apprendre et mieux comprendre notre environnement. Mais la mauvaise gestion de l'incertitude entraîne anxiété et décisions aberrantes, et ceci peut mener à des vérifications répétées, compulsives, de nos propres gestes ou de leurs conséquences. Nous comprenons très peu les bases biologiques des vérifications normales et anormales, pourtant leur connaissance permettrait de mieux gérer les troubles du comportement chez l'humain.

Nous proposons un projet de recherche fondamentale basé sur nos découvertes récentes sur le rôle des régions du cortex frontal. Il est conçu pour identifier les bases cérébrales des décisions de vérifier. Ce projet s'inscrit dans un programme plus large à fins translationnelles, qui compare et décrit chez l'Homme et le singe l'organisation fonctionnelle des régions cérébrales frontales, et qui permettra une meilleure compréhension des troubles de la décision et de l'apprentissage comme dans les troubles obsessionnels et compulsifs.

Le projet, d'une durée de 5 ans, implique 3 groupes d'expériences parallèles impliquant des macaques rhesus. Les expériences impliquent des procédures d'apprentissage par renforcements positifs, des méthodes d'observation de l'activité neuronale qui requièrent des chirurgies (enregistrements électrophysiologiques, imageries fonctionnelles) et des techniques couplées de perturbation temporaire de l'activité neuronale (micro-injections intracérébrales pharmacologiques, pharmacogénétique) pendant la réalisation de tâches cognitives.

L'utilisation du modèle singe est justifiée par des recherches récentes montrant une organisation des régions cérébrales étudiées très comparables entre les primates et les humains, et très différentes d'autres modèles comme les rongeurs. Ceci permet donc une véritable approche translationnelle pour de futures applications précliniques. Les comportements étudiés sont comparables à ceux observés chez l'humain et les tâches comportementales seront transférable directement à l'humain et au domaine clinique.

Les expériences seront basées sur 3 groupes de 6, 4 et 3 animaux (total=13) participants à des méthodes différentes. Tous les animaux seront hébergés dans des volières réglementaires et au minimum en couple (sauf situation exceptionnelle mettant l'animal en danger). Les procédures les plus invasives incluent des anesthésies générales et des chirurgies crâniennes pour pose d'implants chroniques. Ces procédures sont réalisées en recherchant la minimisation de l'impact sur le bien-être animal et en menant des suivies permanentes de la santé des animaux. S'il y a un faible risque d'effets néfastes, notamment la déshydratation des animaux, et l'infection du matériel implanté sur le crâne, toutes les méthodes de suivi de la douleur, des conditions physiques et psychologiques des animaux sont réalisées en continu sur toute la durée de présence des animaux et avec le soutien du vétérinaire pour prévenir activement des effets négatifs. En plus, chaque procédure est conditionnée par un critère d'arrêt spécifique basée sur des données vétérinaires établies.

Les procédures ont été élaborées pour affiner et limiter le nombre d'animaux (utilisations de comparaisons intra-individuelles, modèles statistiques mixtes, modèles computationnels) et de limiter l'impact sur ceux-ci (techniques d'enregistrements raffinées utilisant des matériaux biocompatibles de dernière génération). Certaines méthodes de perturbation cérébrales impliqueront des procédures

modernes de pharmacogénétique qui permettent des approches causales moins invasives et réversibles. Les techniques d'imagerie non invasive permettront de valider les techniques de pharmacogénétique, et de confirmer toutes les localisations intracérébrales. Ceci peut éviter le sacrifice en fin d'expérimentation. Certains animaux, seront sacrifiés à la fin des procédures pour fournir une validation histologique standard des approches par imagerie. Si cela est réussi, nous serons en mesure de replacer certains animaux à la fin des expériences. Dans le cas de procédure terminale des analyses histologiques multiples seront réalisées pour optimiser l'utilisation des tissus biologiques.

**9139** Le contrôle du statut inflammatoire de l'intestin est un paramètre crucial de la physiologie, une inflammation exacerbée pouvant conduire à des situations pathologiques, telles que les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), l'apparition de lésions cancéreuses, ainsi que des phénomènes de sensibilité et d'allergies alimentaires. Nous nous proposons d'étudier comment certaines cellules de l'intestin peuvent participer au contrôle de l'inflammation intestinale. Ce projet de recherche fondamentale pourrait, à moyen terme, mener à la découverte de nouvelles pistes pour lutter contre les infections parasitaires et les allergies alimentaires.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R »). (1) L'étude de l'inflammation est un phénomène complexe, impliquant de nombreux types cellulaires, non reproductible in vitro. Nous utiliserons des souris transgéniques pour tester nos hypothèses de travail dans un modèle intégré (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Nous utiliserons 4 lignées de souris transgéniques et des souris de fond pure Balb/c, soit un total d'animaux estimé à 460 individus, sur une durée totale de projet de 3 années.

**9140** Notre étude a pour objectif d'évaluer les techniques de fixation endoscopique dans le tube digestif d'un mini-porc Yucatan du dispositif appelé « Taenia artificiel » dont le rôle est d'étudier et d'interagir avec la flore intestinale ou microbiote. En effet, de nombreuses pathologies (obésité et diabète de type II par exemple) sont des pathologies liées à un dysfonctionnement du microbiote.

Le principe consiste à implanter à demeure dans l'intestin des porcs le « Taenia artificiel » qui est un long tube avec une extrémité proximale en forme de lasso qui pourra être fixé à la paroi digestive et une extrémité distale qui pourra interagir avec les bactéries ou des enzymes présentes dans la lumière intestinale. La fixation se fera avec un clip (comme une agrafe) ou un système de suture endoscopique déjà utilisé chez l'homme dans d'autres indications (fermeture de perforation digestive).

Cette étude expérimentale a pour objectifs de : 1/ montrer l'efficacité du système de fixation (sutures endoscopiques ou clips) du dispositif à la paroi digestive ; 2/ démontrer la tolérance par le tractus digestif de la présence permanente du dispositif "Taenia artificiel" allant de l'estomac au duodénum et au début du jéjunum ; et 3/ permettre d'évaluer la possibilité du "Taenia artificiel" d'interagir avec la flore intestinale.

Le recours à des animaux est une étape indispensable préclinique pour permettre l'utilisation chez l'homme du dispositif "Taenia artificiel". Les nombreuses similitudes anatomo-physiologiques, qui rapprochent l'organisme du porc à celui de l'homme, permettent d'obtenir une comparaison fiable des données obtenues et une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques étudiés. Le choix du mini-porc Yucatan a été conditionné par le fait que les animaux doivent être suivis sur une longue période (12 mois) afin de s'assurer que le dispositif ne migre pas or c'est un animal qui ne va pas beaucoup grossir et restera donc facilement manipulable. Au total, il est prévu 24 porcs afin d'étudier 5 différents dispositifs d'ancrage. C'est le nombre minimal nécessaire afin d'évaluer les différents dispositifs d'ancrage. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des porcs. La fixation du dispositif se fera au cours d'une endoscopie sous anesthésie générale et les antalgiques appropriés seront administrés en post-intervention. Un suivi quotidien permettra d'évaluer l'état général de l'animal, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal,

révélateurs du niveau de douleur. Il y aura plusieurs contrôles radiographiques et endoscopiques pendant toute la durée du projet. Les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Les résultats de cette étude permettront de mieux comprendre et traiter de façon mini-invasive de nombreuses maladies chroniques en rapport avec une anomalie de microbiote intestinal.

**9141** Pour anticiper l'interdiction en 2015 du bisphénol A (BPA) dans tous les conditionnements alimentaires, les industriels ont progressivement substitué le BPA par un autre bisphénol possédant des propriétés physicochimiques similaires à celles du BPA, le bisphénol S (BPS). Le BPS est utilisé pour la fabrication de biberons, de vaisselles pour enfants et en tant que révélateur dans les papiers thermiques. Le BPS est actuellement présent dans 100 % des poussières d'intérieur en Amérique du Nord et dans 81 % des échantillons d'urine de la population générale en Asie et aux Etats-Unis. En outre, le BPS est plus persistant dans l'environnement que les autres bisphénols. Cette prévalence élevée de l'exposition humaine au BPS est préoccupante en raison du passage avéré du BPS à travers le placenta et de ses capacités à perturber le système hormonal, notamment les hormones stéroïdiennes, dont l'équilibre est indispensable au développement fœtal. Sur le modèle de la brebis gravide, nous avons précédemment mis en évidence que le fœtus est exposé à une dose 10 fois inférieure à celle de sa mère. Le fœtus a de plus faibles capacités que sa mère à transformer le BPS en un métabolite inactif, le BPS Glucuronide (BPSG). De plus, le passage placentaire du BPS du fœtus vers la mère est également très faible. En conséquence, le BPS est très lentement éliminé du compartiment fœtal. En outre, le BPSG dans le compartiment fœtal est capable de se réactiver en BPS, ce qui entraîne une persistance et une accumulation du BPS dans le compartiment fœtal. Ainsi, même si le passage materno-fœtal du BPS est faible, l'accumulation du BPS dans le compartiment fœtal au cours de la gestation pourrait potentiellement conduire à des effets adverses sur le développement fœtal. Des effets du BPS sur la production de la testostérone comparables à ceux du BPA ont été mis en évidence in vitro et in vivo. Notre hypothèse est que le BPS pourrait perturber l'équilibre stéroïdien de l'unité foeto-materno-placentaire au cours de la gestation. Nous utiliserons le modèle de la brebis gravide, qui est un très bon modèle pour l'homme en terme de physiologie de la gestation. La complexité des fonctions physiologiques mises en jeu ne permet pas le remplacement du modèle animal intégré par des approches cellulaires forcément réductrices qui ne peuvent mimer les processus d'échanges placentaires et les relations étroites materno-foeto-placentaires qui déterminent l'équilibre stéroïdien. En outre, ce modèle autorise la réalisation de prélèvements sanguins maternels répétés, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors que les rongeurs ne peuvent être prélevés qu'une seule fois. Les prélèvements sont faits à l'aide d'une aiguille fine de façon à réduire au minimum la douleur associée à la ponction. Les brebis seront hébergées en boxe collectif avec leurs congénères du même groupe d'administration dans le respect des règles de raffinement (litière de paille fraîche, eau et aliment ad libitum.). Les expérimentations ont lieu dans des locaux adaptés, assurant le confort et le bien-être des animaux. Pendant le 3ème mois de gestation, trente brebis recevront une administration intramusculaire quotidienne de solvant (groupe témoin) ou de BPS (groupes traités). Trois groupes de dix brebis seront utilisés, un groupe contrôle, deux groupes traités avec une faible dose et avec une forte dose de BPS. Le plus faible niveau de dose permettant de reproduire une exposition proche de l'exposition humaine. Des prélèvements de liquides biologiques et de tissus d'intérêts seront réalisés afin de déterminer leurs niveaux de stéroïdes, mais également l'exposition au BPS.

**9142** La maladie (ou « démence ») à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer (MA). Ainsi elle représente 20% des patients déments. La maladie commence entre 50 et 85 ans. Le nombre de patients avec une MCL en France est estimé à environ 200000 sujets. Il s'agit donc comme pour la MA d'un enjeu majeur de santé publique. Les symptômes habituels de la MCL associent troubles cognitifs (troubles de la mémoire épisodique, de la mémoire de travail, des fonctions exécutives et troubles visuo-perceptifs...), troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), syndrome

parkinsonien -souvent discret en début de maladie- et fluctuations. Au niveau anatomopathologique, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats synucléines positifs dans le cerveau, formant les corps de Lewy. On en retrouve également dans la maladie de Parkinson, sauf que dans la MCL, elles sont plus diffuses et on ne note pas d'atteinte spécifique de la substance noire. Les modèles animaux existant à l'heure actuelle sont créés pour modéliser la maladie de Parkinson et présentent souvent cette atteinte prédominante de la substance noire.

A partir d'une cohorte autopsique de 909 sujets, une équipe de Seattle a pu déterminer que le facteur de risque génétique le plus fort de la MA, l'allèle E4 de l'apolipoprotéine E (APOE4), était retrouvé à une fréquence de 31,9% dans la MCL, un résultat proche de celle retrouvée dans la MA (38,1%), alors qu'il n'était que de 19,1% dans la maladie de Parkinson.

Objectifs scientifiques : Au vu de ces résultats, nous proposons d'étudier le rôle de l'APOE4 dans la MCL. A cette fin, 1/ nous créerons un nouveau modèle double transgénique de la pathologie (modèle que nous nommerons APOLEWY), dans lequel l' $\alpha$ -synucléine humaine est surexprimée sur un fond génétique où l'allèle ApoE murin est remplacé par l'allèle APOE4 humain sur lequel 2/ nous évaluerons l'impact de ce facteur de risque sur le décours d'une MCL classique, aux niveaux comportemental (mémoire et moteur), et anatomopathologique.

Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques d'un nouvel animal transgénique, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, les mêmes groupes d'animaux subiront l'ensemble des tests comportementaux et ce seront ces mêmes groupes qui seront analysés à la fin d'un point de vue anatomopathologique. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous travaillerons qu'avec des souris mâles, qu'en plus de notre groupe APOLEWY, nous constituerons plusieurs groupes contrôles, groupes que nous étudierons à différents âges, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 300 souris. Afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début des tests comportementaux. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal puisse ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage, de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction). Les tests comportementaux étant stressant pour les animaux, ceux-ci seront observés quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse ou tout changement de comportement important (prostration, convulsions, isolement, absence de toilettage, présence de plaies, posture voutée, perte de poids). En cas d'anomalies, un entretien entre le responsable du projet et le responsable du bien-être animal sera effectué afin de prendre une décision concernant le devenir des animaux (mise à mort ou non avant la fin de l'expérience). Les conditions d'expérience sont telles que l'apparition de tels signes de détresse ou changements comportementaux ne devrait se produire qu'à titre exceptionnel. A noter, la mise à mort sera systématiquement réalisée par une personne formée à ce type d'acte.

**9143** La chimiothérapie contre les cancers provoque des effets secondaires toxiques. La toxicité au niveau du cœur est particulièrement dangereuse. Elle représente l'effet secondaire majeur de différents traitements anti-cancéreux, en particulier ceux qui utilisent des drogues du groupe des anthracyclines. Cette cardiotoxicité peut se manifester plusieurs années après la thérapie et elle est souvent irréversible. Les mécanismes sous-jacents restent mal connus, et il n'existe pas de stratégie efficace et ciblée pour prévenir ou traiter cette toxicité cardiaque. Comme le nombre de survivants des maladies cancéreuses s'accroît, les effets secondaires liés à la chimiothérapie deviennent un problème majeur de santé publique. Par conséquent, il devient urgent de traduire des résultats de la recherche fondamentale en applications cliniques potentielles.

Des recherches antérieures menées par le laboratoire principal porteur du projet in vitro et ex vivo chez le rat ont permis d'identifier un mécanisme régulateur du métabolisme cardiaque comme une cible majeure des agents chimiothérapeutiques. Ce mécanisme fait l'objet de l'étude proposée ici, en



collaboration avec notre laboratoire. Elle utilisera un modèle animal préclinique in vivo : des souris soumises à une chimiothérapie qui affecte le fonctionnement cardiaque. Le but du projet sera (i) de valider les résultats prometteurs des études antérieures obtenues sur des modèles ex vivo, (ii) de mieux comprendre le dysfonctionnement du mécanisme régulateur identifié au niveau du cœur dans l'animal in vivo et (iii) de tester de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques qui ciblent cette régulation. Pour cela, l'étude va faire appel à des souris transgéniques, dont une protéine clé de cette régulation sera rendue non fonctionnelle spécifiquement dans le cœur de la souris adulte. Nous allons ainsi pouvoir étudier l'effet de l'absence de cette protéine sur le développement de la cardiotoxicité et son rôle dans des traitements cardioprotecteurs. En effet, ce mécanisme régulateur présente un site d'action cardioprotecteur, car son activation pourrait prévenir l'apparition des effets secondaires cardiaques ou même diminuer rétroactivement les conséquences de ces effets secondaires. Nous testerons donc un traitement par une molécule de type polyphénol, connue pour activer le mécanisme ciblé, et dont les effets bénéfiques sur le cœur et les vaisseaux ont été démontrés. Nous étudierons la fonction cardiaque des souris par imagerie échographique afin d'estimer la cardiotoxicité dans les différentes conditions testées. Ce type d'imagerie est totalement non invasif et elle fait référence comme technique in vivo d'évaluation de la fonction cardiaque.

Le modèle in vivo utilisé dans cette étude est conforme aux dernières directives dans le domaine de la cardio-oncologie, en particulier en s'approchant de la pathologie humaine par l'étude de la cardiotoxicité chronique qui se manifeste après un certain délai. L'étude, qui inclut 330 souris au total, respectera la règle des 3R. (1) Réduire : Le nombre d'animaux a été déterminé sur la base d'études publiées pour donner la puissance statistique adéquate avec un minimum d'animaux. Le protocole du traitement par l'agent anticancéreux a été défini sur la base de travaux publiés pour permettre le gain d'un maximum d'informations à partir des individus étudiés. L'exploitation maximale de matériel biologique est prévue dans le protocole (différents organes vont être prélevés et différents dosages réalisés). Le schéma des groupes expérimentaux permet de reproduire et d'utiliser des animaux d'une manière la plus avantageuse. (2) Raffiner : Choix du modèle (traitement chronique chez la souris) et des procédures (dose et durée du traitement chimiothérapeutique, choix des points limites, procédures d'euthanasie) ont été faits conformément à l'état actuel des connaissances et exigences envers ce type d'étude. (3) Remplacer : Basé sur les résultats publiés par le laboratoire et d'autres groupes, d'autres modèles alternatifs seront étudiés (cardiomyocytes en culture).

**9144** *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville (« communautaires ») et les infections acquises à l'hôpital (« nosocomiales »). Ce pathogène, en dehors du fait qu'il soit associé à une résistance élevée aux antibiotiques, est également doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines. Parmi ces toxines, la toxine de Panton et Valentine (« PVL ») est produite par moins de 5% des souches circulant en France mais est plus fréquemment retrouvée dans d'autres régions géographiques, en particulier aux USA. Elle est responsable de pneumonies nécrosantes, notamment chez l'enfant et le jeune adulte sans facteur de risque. Ces infections sont associées à une mortalité extrêmement rapide, même lorsqu'elles sont prises en charge précocement. Les antibiotiques à activité anti-toxinique utilisés dans cette pathologie constituent actuellement la pierre angulaire du traitement. Toutefois, ils ne suffisent pas à réduire la mortalité de façon significative.

Dans ce contexte, d'autres alternatives innovantes (anticorps) sont actuellement en développement et visent à neutraliser la ou les toxines pathogènes produites par *S. aureus* afin d'en diminuer la virulence. Des études récentes ont en effet mis en évidence l'action concertée de l'ensemble des toxines dans la pathogénicité de *S. aureus* et donc la nécessité d'utiliser des agents thérapeutiques ciblant simultanément plusieurs toxines. Ces anticorps sont actuellement à l'étude dans des modèles pré-cliniques. Considérant que la souris n'est pas sensible à l'action de la toxine PVL, le choix s'est porté sur une autre espèce animale, le lapin, qui constitue un modèle de choix pour l'évaluation de l'efficacité de thérapeutiques dans les infections à *S. aureus* produisant la toxine PVL.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité de l'administration curative de différentes doses d'un cocktail d'anticorps candidats dans un modèle de pneumonie nécrosante à *Staphylococcus aureus* chez le lapin, seule ou en association avec un antibiotique. La durée de l'étude sera de 12 mois.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (au lieu de 10) grâce aux améliorations techniques de la procédure et à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Plusieurs éléments ont été mis en place pour répondre au concept du raffinement : Le design du gilet utilisé pour le maintien du cathéter et permettant la libre circulation de l'animal dans sa cage a été amélioré pour en accroître son confort. Les conditions d'hébergement ont également été optimisées par l'enrichissement du milieu. Enfin, l'utilisation de l'analgésique buprénorphine a été mise en place pour réduire la douleur post-opératoire. Dans le contexte de l'étude, le remplacement du modèle in-vivo pour la constitution d'une pneumonie expérimentale par un autre système n'était pas envisageable notamment pour des aspects de diffusion tissulaire et systémique.

Au total pour cette étude, 150 lapins New Zealand seront nécessaires. Une évaluation rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

**9145** La prise en compte du bien-être animal nécessite la sensibilisation, la formation et l'acquisition des compétences pour le personnel concevant ou appliquant des procédures expérimentales. L'acquisition de ces compétences est un prérequis et leur mise à jour et leur suivi en fonction des besoins des projets scientifiques est obligatoire. Nous souhaitons mettre en place une formation d'initiation à la chirurgie expérimentale qui est une formation réglementaire soumise à un agrément par le Ministère de l'Agriculture. Elle est obligatoire pour les personnes concevant des projets comprenant des procédures chirurgicales ou réalisant ces procédures. Le but de cette formation est d'acquérir des notions élémentaires et des gestes et attitudes de base nécessaires à l'expérimentateur pour réaliser une procédure définie avec une prise en charge satisfaisante de l'anesthésie, de l'analgésie et du bien-être animal.

Chaque session de formation sera clôturée par une discussion, une évaluation et une validation d'acquis. Elle comprend un enseignement théorique de 9h et un enseignement pratique de 14h30. Elle permet tout d'abord de mettre en évidence les contraintes liées au choix du matériel et à l'organisation de la table opératoire puis de faire acquérir au manipulateur les compétences pour intervenir sur l'animal dans les étapes pré, per et post-opératoires. Les ateliers proposés dans cette formation sont l'anesthésie, l'analgésie, les biopsies, les points de suture et une expérience chirurgicale simple. Ces différents ateliers permettent d'illustrer la difficulté de la conception d'une procédure chirurgicale. Ils prennent en compte le choix du matériel, la gestion des différentes étapes chirurgicales et la prise en charge du suivi post-opératoire.

Chaque session de formation de dix stagiaires nécessite l'utilisation de vingt souris. Comme nous envisageons de réaliser quatre sessions par an, le besoin en animaux sur cinq ans est de 400 souris au total.

Dans ce cadre, nous utiliserons des animaux issus des élevages internes de l'établissement utilisateur. Tous les animaux seront hébergés dans des portoirs ventilés avec un enrichissement du milieu et un contrôle régulier assuré par les zootechniciens.

**9146** Reconnue comme point chaud de biodiversité, la région occidentale de l'Océan Indien compte une très grande diversité d'espèces animales vertébrées. De par sa richesse mais également son fort taux d'endémisme, la faune de l'île de Madagascar reflète à elle seule l'importance des écosystèmes de cette région en terme de conservation de la biodiversité. Les régions tropicales sont également des zones très riches en terme de diversité d'agents infectieux et sont reconnues comme étant à haut risque d'émergence de zoonoses. Dans l'ouest de l'Océan Indien, et à Madagascar en particulier, une large diversité d'agents infectieux a été décrite chez les oiseaux marins, les petits mammifères terrestres, et les chauves-souris. Les modalités de transmission de ces agents infectieux restent néanmoins méconnues.

Les changements environnementaux saisonniers ont des effets majeurs sur le cycle de vie de nombreux organismes, en influençant par exemple la période de reproduction, la migration et de nombreux autres comportements. La régularité de ces événements affecte également les interactions entre les hôtes et leurs agents infectieux. Ces chauves-souris qui peuplent les îles du sud-ouest de l'Océan Indien ont un comportement grégaire saisonnier très marqué, qui consiste à former des

colonies, en particulier pendant la période de reproduction, potentiellement propices à la transmission d'agents infectieux.

Les objectifs scientifiques de ce projet seront de caractériser la diversité d'agents infectieux (virus, bactéries, parasites) circulant dans les colonies de chauves-souris et d'étudier la dynamique temporelle de transmission au sein de ces colonies. L'étude sera basée sur la capture de chauves-souris et la collecte de matériel biologique en vue de leur analyse au laboratoire. Pour chaque animal, des prélèvements biologiques seront réalisés de façon systématique afin de récolter de la salive, de l'urine, des fèces, et des ectoparasites. La collecte de matériel biologique sera réalisée de manière répétée au sein de chaque colonie d'étude, afin d'étudier la dynamique temporelle d'infection à l'échelle des populations. Les chauves-souris seront marquées individuellement à l'aide de bagues alphanumériques afin d'étudier la dynamique d'infection à l'échelle individuelle (pour l'espèce *Rousettus madagascariensis*, famille des Pteropodidae).

La réalisation de ce projet implique la capture et la manipulation d'espèces animales dans leur milieu naturel (pas de possibilité de remplacement). Le nombre maximal d'animaux utilisés dans le projet est de 8460; il dépendra fortement des possibilités de captures sur le terrain. Le nombre maximal de chauves-souris échantillonnées par session de capture variera entre 30 et 250, en fonction de l'espèce considérée et de son abondance (13 espèces seront étudiées). Les espèces et effectifs maximal estimés par population sont : *Rousettus madagascariensis* : x250; *Mops leucostigma* : x130; *Mormopterus jugularis* : x100; *Chaerephon leucogaster* : x50; *Triaenops menamena* : x50; *Paratriaenops auritus* : x50; *Myotis goudoti* : x50; *Miniopterus griveaudi* : x50; *Miniopterus aelleni* : x50; *Miniopterus gleni* : x50; *Macronycteris (Hipposideros) commersoni* : x30; *Paremballonura atrata* : x30; *Mops midas* : x50. Un maximum de trois sessions de captures sera réalisé par année et par espèce, afin d'obtenir à la fois des résultats valides d'un point de vue statistique sans pour autant affecter la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Les animaux capturés seront immédiatement placés dans un pochon individuel en tissu, au calme. Ils seront hydratés, nourris et relâchés sur le site de capture. Si l'animal présente un stress anormalement élevé après la capture (e.g. hyperventilation, immobilisation, incapacité à s'envoler), il sera immédiatement relâché, sans que les procédures expérimentales soient réalisées. Si l'animal présente un comportement anormal suite à la réalisation des procédures expérimentales, il sera hydraté (et nourri avec des fruits pour *Rousettus madagascariensis*), et maintenu en observation jusqu'à son rétablissement, puis sera observé à distance pendant plusieurs minutes afin de vérifier qu'il rétablisse progressivement un comportement identique à celui avant capture. Dans le cas exceptionnel où un animal ne serait pas capable de rétablir un comportement normal suite à sa capture, sa manipulation ou à la réalisation des procédures expérimentales, celui-ci sera mis à mort.

**9147** La protéine IL4I1 est une enzyme produite par des cellules du système immunitaire (cellules qui défendent l'organisme contre les agents infectieux, les tumeurs et les agressions) chez l'homme et la souris. Nous avons précédemment montré qu'elle freine la réponse immunitaire en bloquant les fonctions d'une catégorie de cellules du système immunitaire appelée lymphocytes T. Les lymphocytes T jouent un rôle anticancéreux en reconnaissant et tuant les cellules cancéreuses. Or, IL4I1 est détectée dans les cancers humains. Nous avons déjà montré chez la souris que la présence d'IL4I1 est favorable à la croissance des cancers en permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort induite par les lymphocytes T. Ces résultats suggèrent qu'IL4I1 pourrait être impliquée dans le mauvais pronostic de certains cancers chez l'homme et incitent à développer de nouveaux traitements capables de bloquer cette enzyme.

Le projet actuel a précisément pour but de tester in vivo l'effet protecteur antitumoral d'un inhibiteur d'IL4I1 chez la souris. Ce composé chimique a été identifié en partenariat avec un groupe de chimistes et caractérisé in vitro dans notre laboratoire.

L'inhibiteur d'IL4I1 n'a pas d'effet direct sur la prolifération des cellules tumorales en culture. Son effet s'exerce sur les lymphocytes T antitumoraux et ne peut donc être exploré que dans l'animal entier ayant un système immunitaire fonctionnel.

Dans un premier temps, la tolérance des animaux à deux doses de l'inhibiteur sera testée (requiert 10 animaux).

Puis, les animaux recevront une injection de cellules tumorales accompagnée ou non d'une administration de l'inhibiteur à la ou les dose(s) non toxique(s). Le test sera répété plusieurs fois pour valider la robustesse des observations réalisées (requiert 160 animaux au total).

Les animaux seront observés quotidiennement. Toutes les mesures permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux seront prises, notamment des mesures d'enrichissement du milieu telles que briquettes en bois, maisonnettes en plastique, feuilles de cellulose pour faire un nid. Les injections seront réalisées sous anesthésie au gaz.

A l'issue de 12 jours, les animaux ayant reçu des cellules tumorales seront mis à mort afin de comparer la croissance des cancers dans le foie entre les animaux traités et non traités.

Le nombre total d'animaux nécessaires est évalué à 170.

**9148** La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. La thérapie génique, consiste à apporter des gènes thérapeutiques aux cellules « malades » dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le mauvais fonctionnement d'une protéine essentielle et où les médicaments conventionnels ne sont que de peu d'utilité. Le seul traitement envisageable est alors de pallier cette déficience via l'administration exogène d'une protéine thérapeutique en transférant son gène. L'utilisation d'un gène comme médicament permettra d'obtenir une expression continue de la protéine thérapeutique au sein des cellules cibles, ce qui représente un atout certain.

Dans ce projet, nous testons de nouveaux traitements applicables à une grande variété de maladies oculaires, en particulier les dégénérescences rétiniennes héréditaires. Nos traitements consistent en une unique injection intraoculaire ou systémique d'un vecteur transporteur de gène thérapeutique. L'objectif est ici d'étudier l'efficacité du transfert des gènes ainsi que les effets thérapeutiques de ces derniers. Ces traitements ne peuvent être testés qu'in vivo car les propriétés pharmacologiques des traitements ne peuvent être évaluées que dans des conditions physiologiques.

Nous utiliserons dans ce projet trois lignées de souris atteintes d'une dégénérescence rétinienne afin de pouvoir tester différents profils de pathologies et une lignée de souris normale pour les contrôles. Au total 390 souris seront nécessaires à cette étude.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et des électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

**9149** La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans. On estime à un million le nombre de personnes concernées en France et ce nombre ne cesse de croître avec le vieillissement de la population. Les causes précises de la maladie restent mal connues à ce jour.

Afin de mieux comprendre la biologie de la DMLA et de pouvoir développer des thérapies efficaces, une étude pangénomique de plus de 17 000 patients atteints de DMLA et de 60 000 contrôles a été réalisée. Cette étude a mis en évidence plusieurs loci comme étant associé à un risque accru de développer une DMLA.

Parmi ceux-ci, un en particulier a attiré notre attention. Il s'agit d'un allèle du gène codant pour le transporteur de lactate, SLC16A8.

Dans des études antérieures, l'équipe avait montré que le facteur trophique RdCVF protège les cônes en stimulant la glycolyse aérobie, or le lactate est un produit de la glycolyse aérobie.

Afin de mieux comprendre le rôle du gène SLC16A8 dans le développement de la DMLA, nous avons fait créer un modèle murin porteur de l'allèle à risque du gène SLC16A8 identifié dans l'étude pangénomique associative.

Le but de ce projet est d'étudier le phénotype rétinien de ce modèle au cours du vieillissement.

Au total 40 souris seront nécessaires à ce projet en incluant les contrôles.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe et d'une anesthésie cornéenne pour les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

**9150** La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques afin de restaurer la vision chez ces patients. Une voie thérapeutique possible est de stimuler les neurones de la rétine encore présents.

Notre stratégie consistera à exprimer des protéines photosensibles dans des cellules de rétines aveugles de manière à les rendre sensibles à la lumière. Afin de trouver la stratégie thérapeutique la plus efficace possible, il nous faut comprendre comment les différents neurones qui forment le réseau rétinien travaillent ensemble pour traiter l'information visuelle.

Notre projet se décompose donc en deux parties.

Dans la première partie, nous tenterons de comprendre le rôle des différents types cellulaires dans le traitement de l'information visuelle. Nous utiliserons des souris normales ainsi que des modèles murins permettant une expression cellule-spécifique des protéines photosensibles.

Dans un second temps, nous tenterons de redonner la vision à des souris aveugles. Nous utiliserons un modèle murin de rétinopathie pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique.

Les protéines photosensibles seront administrées par voie intraoculaire à l'aide de vecteurs viraux.

Suite aux injections, nous effectuerons uniquement des fonds d'œil sur l'animal vivant. L'ensemble des études nécessaires se feront ex vivo (analyses immunohistochimiques, fonctionnalité) après euthanasie de l'animal.

Au total 650 souris seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

**9151** La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans. On estime à un million le nombre de personnes concernées en France et ce nombre ne cesse de croître avec le vieillissement de la population. Les causes précises de la maladie restent mal connues à ce jour. Cependant, la lumière et son stress oxydant induit ont été identifiés comme des facteurs de risque.

Dans ce projet nous voulons créer un modèle murin de DMLA inductible. Si ce modèle est validé, il pourra ensuite être transféré à d'autres espèces animales. Le but est de pouvoir tester dans l'avenir de nouvelles thérapeutiques qui permettront de soigner ou de ralentir l'évolution de la DMLA. Pour cela, nous accélérerons le processus de dégénérescence induit par la lumière.

Pour créer ce modèle, nous injecterons des molécules ayant des propriétés spécifiques à des souris normales adultes. Au total 212 animaux seront nécessaires en incluant les contrôles et les tests préliminaires.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude dont l'hypothèse repose sur des tests in vitro permettant de valider cette stratégie.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse (selon la procédure expérimentale) et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux. Le nombre d'animaux utilisés sera 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 ». Des études préalables in vitro ont déjà été effectuées.

**9152** *Dermanyssus gallinae* (Acari : Mesostigmata), le pou rouge des poules, est un acarien hématophage inféodé aux oiseaux, dont la prévalence est élevée en élevage de poules. Responsable de dégâts directs (stress entraînant une baisse de rendement, déclassement des œufs tachés par les acariens) et indirects (transmission de salmonelles, allergies chez le personnel), il doit être combattu, mais s'avère largement récalcitrant aux moyens de lutte conventionnels. En effet, comme il ne vit pas sur l'hôte, mais passe l'essentiel de sa vie caché dans des interstices divers (perchoirs, pondoirs,...) et en particulier sous les fientes de poule séchées, son contrôle par l'application de produits pulvérisés est généralement peu efficace. Non seulement traiter directement les animaux n'est pas approprié, mais encore les traitements préconisés, par pulvérisation dans le bâtiment, ne touchent qu'une infime partie de la population et sont souvent d'une efficacité limitée.

Face à l'expansion actuelle de l'acarien et dans un objectif de réduction des intrants de synthèse, le développement de moyens de lutte alternatifs est un enjeu majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet : il vise à développer la lutte contre l'acarien par manipulation des émissions chimiques provenant de la poule et/ou de ses fientes. Partant du principe que rendre la poule inappétante pour l'acarien et/ou les habitats fournis au pou par les fientes sèches inhospitaliers contribuerait fortement à limiter les populations du parasite, nous collaborons avec une société qui développe des additifs alimentaires à base de composés d'origine végétale. Pour ce faire, nous cherchons à identifier des molécules volatiles émises directement par le corps de la poule et/ou par ses fientes après ingestion d'un additif alimentaire actuellement disponible et à rechercher parmi elles celles qui sont répulsives vis-à-vis du pou rouge. Afin d'évaluer avec robustesse les changements induits par cette ingestion, en prenant en compte la variabilité interindividuelle probablement élevée, nous envisageons d'impliquer au total 20 poules dans les expérimentations.

En ce qui concerne la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nous ne pouvons pas remplacer l'animal cible (la poule), car nous nous trouvons face à des processus biologiques et biochimiques dont nous ne maîtrisons pas le détail et que nous ne pouvons donc pas mimer. Le nombre poules à tester est fixé à 400, car c'est le minimum pour obtenir des données d'écologie chimique statistiquement robustes (nécessité d'évaluer les variations interindividuelles et intra-individuelles des odeurs émises pour les prendre en compte dans l'évaluation des changements induits par l'additif alimentaire). Nous raffinons les expérimentations en offrant aux poules la possibilité d'exprimer leur comportement naturel (grattage, picorage, ponte). En outre, aucune manipulation douloureuse n'est pratiquée durant le projet.

**9153** Il est maintenant bien admis que le cerveau conserve tout au long de la vie, la capacité de se régénérer en produisant de nouvelles cellules et en particulier de nouveaux neurones, et ce, même à l'âge adulte. Plusieurs régions du cerveau ont été identifiées comme capables de se régénérer, en particulier l'hypothalamus. L'hypothalamus est une zone localisée à la base du cerveau, de part et d'autre du troisième ventricule qui contrôle les principales fonctions biologiques dont la reproduction. Toutefois, nous ne connaissons pas les facteurs capables de déclencher cette activité de régénération neuronale aussi appelée neurogenèse. La connaissance de ces facteurs pourrait nous donner des pistes intéressantes pour trouver des substances capables de stimuler la production de nouveaux neurones dans le cerveau adulte. L'objectif du projet est d'identifier les facteurs inducteurs de neurogenèse présents dans le liquide céphalorachidien (LCR) qui agiraient directement dans l'hypothalamus en contact avec le LCR. Cette étude sera réalisée grâce à une approche d'analyse par spectrométrie de masse.

Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée qu'in vivo, car les analyses ne peuvent pas être faites ou reproduites in vitro et encore moins in silico, mais l'approche longitudinale (chaque animal sera son propre témoin) permet de réduire le nombre d'animaux expérimentaux.

Réduire : Dix brebis constitueront le groupe d'animaux expérimentaux parce que nous ne pouvons pas écarter la perte d'un ou deux animaux au cours de l'expérience qui s'étale sur 12 mois.

Raffiner : Des mesures de réduction de la douleur seront mis en place pendant les procédures expérimentales (injection d'analgiques, contrôle de l'anesthésie, administration d'anti-inflammatoires). Les brebis seront sous observation régulière (surveillance de la température corporelle et de la prise alimentaire, observations comportementales) et nous mettrons en œuvre des procédures veillant à réduire le stress (brebis maintenues ensemble au sein d'un environnement social stable, conditions adaptées aux herbivores avec litière de paille et foin ad libitum) et l'inconfort des brebis (administration prolongée d'anti-inflammatoire, traitement quotidien d'antibiotiques pendant 5 jours en cas d'infection).

**9154** L'amblyopie est un déficit visuel fonctionnel lié à une perturbation du signal visuel durant une période dite critique du développement. Elle est caractérisée chez l'homme par une acuité visuelle faible et non améliorable après l'âge de 8 ans. Elle touche 2 à 5% de la population. Le but de ce travail est d'identifier les mécanismes neuronaux à l'origine de cette perte de réponse du cortex aux stimuli visuels. La plupart des travaux effectués dans ce domaine se sont intéressés à la plasticité synaptique. Mais nous savons désormais que l'excitabilité intrinsèque des neurones corticaux joue également un rôle capital dans ces phénomènes de plasticité. Ce projet propose de déterminer le rôle de la modification de l'excitabilité intrinsèque neuronale à long terme dans la plasticité cérébrale du cortex visuel en développement. Le modèle animal actuellement utilisé dans la littérature pour l'enregistrement électrophysiologique de neurones visuels est le rat. Tout d'abord, nous observerons l'impact d'une privation monoculaire chez le rat pendant la période critique de développement du système visuel sur la régulation homéostatique de l'excitabilité intrinsèque des neurones visuels dans les 1er relais du système visuel (Corps genouillé latéral (LGN)). Dans un 2ème temps, nous évaluerons le rôle de miR132, un microRNA fortement lié à la déprivation visuelle, dans la modulation de cette excitabilité intrinsèque. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'ensemble des tranches de LGN à partir desquelles les neurones seront enregistrés, seront utilisés en parallèles sur plusieurs postes expérimentaux. Le nombre estimé d'individus nécessaire en fonction des conditions expérimentales et des tests statistiques est de 40. Dans le but de minimiser au maximum les risques de douleur et/ou d'angoisse liés aux interventions chirurgicales, celles-ci sont réalisées sous anesthésie profonde à l'isoflurane associée à une anesthésie locale au chlorhydrate d'oxybuprocaine. Les animaux sont ensuite remis sous la mère et surveillés quotidiennement. Ce projet permettra de mettre en évidence le rôle de l'excitabilité neuronale intrinsèque dans l'amblyopie, un déficit visuel fréquent et important.

**9155** Ce travail est une étude expérimentale sur les effets cardiovasculaires d'une substance utilisée dans le traitement du cancer du rein et de la thyroïde, le sorafénib. Le sorafénib augmente la pression artérielle lors de la chimiothérapie chez l'homme. Le mécanisme de cette élévation de tension artérielle n'est pas bien connu. Or la compréhension de ce mécanisme permettrait de proposer une ou plusieurs stratégies pour combattre efficacement l'hypertension artérielle provoquée par cette substance au cours des chimiothérapies.

L'objectif général de ce projet est d'étudier les effets du sorafénib, du sildénafil, une substance qui abaisse la tension artérielle et leurs interactions sur la pression artérielle du rat, espèce couramment utilisée dans les études hémodynamiques simples. Dans une première étude, sous anesthésie générale, ces substances seront administrées par voie intraveineuse et la pression intra-artérielle sera enregistrée grâce à un cathéter introduit dans l'artère carotide. La seconde partie du projet étudiera les effets chroniques d'un traitement de 4 semaines par placebo, sorafénib, sildénafil ou sorafénib plus sildénafil. Dans cette seconde étude, les substances seront administrées par gavage et la pression artérielle sera mesurée à la queue de l'animal grâce à un manchon placé autour de la queue.

L'enregistrement de la pression artérielle ne peut se faire que chez l'animal. Pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, 5 groupes de 20 rats chacun seront utilisés. Le premier groupe sera étudié sous anesthésie générale (première étude) et les 4 autres seront suivis pendant 4 semaines (deuxième étude). L'entraînement des animaux avant leur inclusion dans le protocole permet de réduire leur nombre au strict nécessaire. Les rats seront hébergés 2 par cage au maximum, la nourriture et l'eau de boisson seront libres d'accès et des briques de peuplier seront fournies afin d'enrichir le milieu. Le gavage et la mesure de la pression artérielle à la queue de l'animal, technique non invasive et non douloureuse, peuvent cependant générer un stress qui sera réduit au maximum grâce à un entraînement des rats pendant une semaine avant l'inclusion dans le protocole. Par ailleurs, durant le suivi chronique, les animaux seront pesés une fois par semaine et une vérification journalière permettra d'identifier toute blessure et/ou comportement atone qui entraîneront l'exclusion de l'animal et son euthanasie.

A la fin du suivi chronique, sous anesthésie générale, le sang sera prélevé pour dosages ; des organes tels que le cœur, les reins et les poumons seront prélevés pour analyse ; les artères aortes seront prélevées pour des études de réactivité vasculaire in vitro.

**9156** L'objectif du projet est d'évaluer l'impact de deux extraits d'algues :

- sur le pouvoir pathogène de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc ainsi que sur la réponse immunitaire du porc face à ces infections.
- sur les niveaux d'excrétion et la colonisation de *Salmonella* chez le porc, ainsi que sur leur réponse immunitaire.

En 2012, 69% des porcs abattus dans le Grand Ouest de la France étaient atteints de pneumonie et 15% de pleurésie. Ces maladies entraînent des pertes économiques importantes pour la filière porcine : réduction des performances zootechniques, détérioration de la qualité des carcasses, élévation du taux de saisies à l'abattoir et des coûts 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. En élevage, *Mycoplasma hyopneumoniae* est un pathogène majeur devant être maîtrisé afin de lutter contre les pathologies respiratoires du porc.

Les salmonelles, agent zoonotique, sont des bactéries fréquemment impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives dans les pays développés. Il s'agit de la seconde cause de zoonose en Europe. Les animaux d'élevage, notamment les porcs, constituent des réservoirs de ces bactéries dont ils sont fréquemment porteurs sains. Le porc serait la première source de viande responsable des infections humaines à *Salmonella*. Si *Salmonella* ne provoque pas de maladie chez le porc, réduire sa prévalence et son niveau d'excrétion pourrait à terme permettre de mieux maîtriser le risque pour le consommateur.

Pour les deux procédures, les animaux recevront des extraits d'algues dans leur alimentation (en complément) à partir du sevrage jusqu'à l'épreuve infectieuse. L'état de santé des animaux sera évalué tout au long de la phase de complément) puis au-delà, c'est-à-dire pendant 3 semaines supplémentaires pour l'essai avec *Mycoplasma hyopneumoniae* et 6 semaines supplémentaires pour l'essai sur *Salmonella*. L'état de santé des porcs sera évalué aux travers d'examen cliniques quotidiens, du suivi des performances zootechniques et des analyses réalisées sur les prélèvements biologiques.

Les deux procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (48 et 28 animaux respectivement pour la première et la seconde procédure au total 76 porcs utilisés) ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement et du suivi clinique des animaux notamment en termes de douleur. Ces mesures de raffinement viseront à assurer 1-des conditions d'hébergement limitant l'anxiété potentielle des animaux (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés, etc.) et 2- un suivi clinique des animaux très précis en suivant une grille de notation reprenant les points limites et déclenchant le cas échéant une euthanasie compassionnelle. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable dans la mesure où les animaux utilisés sont nécessaires pour évaluer l'impact des extraits d'algues sélectionnés sur la réponse immunitaire du porc et sur la colonisation et l'excrétion de pathogènes.



**9157** Dans le cadre de l'étude du rôle des récepteurs aux oxystéroïdes (LXRs) dans le processus de dissémination métastatique, nous sommes amenés à évaluer le potentiel de dissémination de lignées de cellules tumorales prostatiques humaines ayant subi ou non une ablation génique de LXRalpha et/ou LXRbeta par la technologie CRISPR/Cas9. En terme plus simple, il s'agit de cellules pour lesquelles les gènes codant les récepteurs LXRs sont inactivés. Ainsi, il sera possible de déterminer, par l'utilisation de ligands synthétiques des LXRs, tel que le GW3965, si les LXRs constituent des cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer de la prostate au stade métastatique. Ce ciblage thérapeutique sera déterminé seul ou en co-traitement avec un anticorps neutralisant de la voie du TGFbeta, déjà utilisé en clinique humaine, notamment dans le traitement du glioblastome. Les cellules utilisées pour cette expérimentation expriment stablement une forme membranaire de GFP (myrGFP) permettant l'identification et la quantification des sites métastatiques au moment de la nécropsie grâce à une station binoculaire à épifluorescence. L'implantation des cellules chez des souris immunodéprimées se fera par une procédure chirurgicale de greffes orthotopiques (intra-prostatique) sous anesthésie. Le nombre de souris utilisés est fixé à 80 à répartir en 8 lots de 10 animaux tel que décrit ci-après. Le projet est programmé sur trois ans car les lots seront réalisés en plusieurs expériences indépendantes. Le nombre d'animaux a été restreint au maximum pour limiter le recours au modèle animal dans la mesure où l'on conserve une statistique satisfaisante. Le bien-être animal sera assuré par une prise en charge de toute douleur qui pourrait apparaître depuis l'intervention chirurgicale jusqu'au point terminal du suivi de la cohorte. Par ailleurs, un souci tout particulier sera apporté à l'enrichissement de la cage de l'animal pour limiter/proscrire tout phénomènes d'anxiété ou de mal-être.

**9158** Notre équipe s'intéresse aux rôles d'une famille de gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras spécifiques aux propriétés physiques particulières. Le premier gène, nommé A, a été découvert à travers sa mutation qui provoque chez le chien et l'homme une myopathie congénitale caractérisée par une faiblesse musculaire. Les rôles du gène B, très proche du gène A, sont encore inconnus. Nous avons généré des souris mutantes pour ces deux gènes afin de comprendre les mécanismes menant à une myopathie dans le cas du gène A et de découvrir les rôles du gène B. Il s'avère que le gène B est encore plus important que le gène A puisqu'en son absence totale, le développement embryonnaire s'interrompt au milieu de la gestation de la souris, par malformation cardiovasculaire, et qu'en cas de réduction partielle de son expression, les souriceaux meurent dans les semaines qui suivent leur naissance, en présentant des défauts métaboliques et une sécheresse et un épaississement de la peau (ichtyose). Ce gène, très conservé entre la souris et l'homme, est donc un gène essentiel, à la fois dans la formation du système cardiovasculaire et le fonctionnement de l'organisme.

Notre projet vise à comprendre comment ce gène, à travers la synthèse de certains acides gras, permet le développement et le fonctionnement de l'organisme. Pour cela, nous mettrons en œuvre une approche originale, allant des études les plus moléculaires jusqu'à des études fonctionnelles à l'échelle de l'organisme, en passant par une caractérisation des anomalies à l'échelle cellulaire pour décrypter les mécanismes en jeu. Nous explorerons ainsi le rôle du gène B au cours du développement embryonnaire, pour la formation du système cardiovasculaire, et après la naissance, pour le métabolisme énergétique, la constitution de la peau et le fonctionnement cardiaque puisque ce gène s'exprime dans le tissu responsable et propagateur de l'activité électrique cardiaque.

L'ensemble de ces études, utilisant des souris présentant des combinaisons complexes de chromosomes, parfois obtenues en deux générations, sera réalisé en huit procédures, au cours desquelles l'utilisation de chaque animal sera rigoureusement optimisée afin de ne recourir qu'au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement fiables, utilisables par la communauté scientifique et médicale. Au total, 991 souris, au maximum, seront nécessaires à ce projet. Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Parmi l'ensemble des animaux qui naîtront, certains pourraient présenter une altération clinique due à un défaut de fonctionnement optimal du cœur et un petit nombre présentera peu après la naissance des manifestations cliniques sévères, avec une réduction de la croissance et un amaigrissement conduisant à la mort. Un suivi attentif sera apporté aux premiers afin de détecter

toute apparition de manifestations cliniques sévères et mettre en œuvre le cas échéant les examens cardiologiques nécessaires, puis leur euthanasie. Les seconds feront l'objet d'un suivi quotidien à biquotidien poussé (pesée, mesure de température) afin que les examens nécessaires puis leur euthanasie soient réalisés avant la perte irrémédiable de leur tonus musculaire.

Sur l'ensemble des procédures envisagées, la très grande majorité des actes réalisés correspondra à des prélèvements post-mortem en très grand nombre afin de recueillir le maximum de données de chaque animal utilisé. Les actes réalisés avant la mort comprendront, selon les procédures, des pesées, mesures de température, électrocardiogrammes, échocardiographies ou injections uniques. L'optimisation des prélèvements et examens réalisés nous permettra de réduire le nombre d'animaux au strict minimum nécessaire. Certains animaux pourront être réutilisés comme reproducteurs. Enfin, l'utilisation d'outils génétiques permettant l'inactivation du gène B dans certains territoires très spécifiques, en évitant des manifestations cliniques sévères dues à son inactivation globale, participera au raffinement de nos procédures, en parallèle de la mise en œuvre d'analyses de pointe, développées en collaboration avec des experts reconnus à l'échelle nationale. Si l'ensemble de notre projet nécessite actuellement le recours à l'animal, il est probable qu'il fasse émerger à l'avenir des expériences complémentaires réalisables *in vitro*.

In fine, notre projet permettra de révéler de nouveaux mécanismes impliqués dans le développement du système cardiovasculaire, le métabolisme énergétique, la constitution de la peau et potentiellement le rythme cardiaque. De notre capacité à comprendre ces mécanismes jusque dans leur précision moléculaire dépendra la possibilité de leur translation pour la compréhension et le traitement de certaines affections humaines, qu'il s'agisse de maladies congénitales très rares (ichtyose, anomalies cardiaques) ou d'affections potentiellement fréquentes comme des perturbations métaboliques.

**9159** Le syndrome métabolique ("metabolic syndrome"; MetS) est un ensemble de facteurs de risque (diminution des taux de HDL, hyperglycémie, hypertension, hypertriglycéridémie, résistance à l'insuline, obésité) favorisant le développement de maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2. Le MetS peut être reproduit chez la souris en exposant de manière chronique les animaux à un régime riche en graisse animale (high-fat). De manière intéressante, des effets bénéfiques de bactéries probiotiques et d'acides gras polyinsaturés oméga-3 sur le développement de MetS ont été mis en évidence, nous souhaitons en comprendre les mécanismes.

Nos objectifs sont d'analyser l'impact, d'une part, d'une supplémentation en bactéries probiotiques et d'autre part, en acides gras, sur des animaux exposés de manière chronique à un régime de type high-fat. Une comparaison avec des animaux sous régime standard recevant les mêmes traitements sera faite. Ainsi 6 lots de 8 animaux seront constitués : (i) lot régime standard, (ii) lot régime standard + bactéries probiotiques, (iii) lot régime standard + acides gras, (iv) lot régime high-fat, (v) lot régime high-fat + bactéries probiotiques, (vi) lot régime high-fat + acides gras. Le nombre d'animaux total s'élève donc à 48.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable pour répondre à la question expérimentale de notre projet qui vise à reconstituer un état physiopathologique et dans lequel les analyses ciblent plusieurs tissus/organes. Elle ne peut être remplacée par des modèles *in vitro* qui ne permettraient pas de reproduire la complexité de la composition cellulaire de chacun des organes et leur environnement, ce dernier pouvant être impacté directement ou indirectement par les régimes/supplémentations. Le nombre de souris nécessaires pour cette étude a été réduit à son minimum (nombre total de souris = 48, 6 lots de 8 animaux/lot) sur l'appui de résultats obtenus dans notre laboratoire. De plus, la conservation des échantillons biologiques issus de cette étude permettra de les utiliser et de les valoriser dans des projets futurs. Enfin nous nous efforcerons d'apporter une réponse adaptée aux contraintes d'inconfort, de stress et de douleur auxquelles les animaux pourraient être exposés (surveillance accrue, suppression de la douleur par des analgésiques ou anesthésiques). Des anesthésiques seront utilisés lors des examens de la rétine (électrorétinographie et imagerie rétinienne, qui sont des examens non douloureux mais nécessitant l'absence de mouvement). Afin de réduire le stress des animaux, ils seront habitués à l'environnement avant le début de chaque expérimentation.

**9160** L'objectif principal de ce projet est de réguler la réponse immune lors de la maladie du greffon contre l'hôte via différentes stratégies thérapeutiques allant de la thérapie cellulaire à l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules clés de la régulation de la réponse immune.

La maladie du greffon contre l'hôte est la complication majeure de la greffe de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur étranger. Elle peut survenir de façon aiguë, dans les semaines qui suivent la greffe, ou de façon chronique, dans les mois ou années qui suivent. Ces greffes restent le seul traitement de recours pour les patients atteints de différentes formes de leucémies et lymphomes et qui ne répondent pas aux chimiothérapies.

Stratégies envisagées

D'une part, nous envisageons une thérapie cellulaire utilisant des cellules régulatrices du système immunitaire. D'autre part, nous souhaitons amplifier directement *in vivo* l'effet des cellules régulatrices par l'utilisation de facteur de croissance de ces cellules. Nous souhaitons soit orienter la réponse vers la régulation pour freiner la maladie du greffon contre l'hôte ou soit l'orienter vers la réponse effectrice pour augmenter l'effet anti tumorale/leucémique. Dans ce sens, pour favoriser la voie effectrice du système immunitaire et augmenter l'effet anti tumoral tout en contrôlant la maladie du greffon contre l'hôte, nous envisageons une immunothérapie via l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les différentes molécules clés de la réponse immune.

Toutes nos approches thérapeutiques seront réalisées dans des modèles de greffe de moelle osseuse chez la souris qui est le modèle *in vivo* de référence pour l'étude de la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte et des leucémies. Ces modèles nécessitent l'irradiation corporelle des animaux et une greffe de moelle osseuse provenant d'animaux de fond génétique différent avec ou sans injection de lignée tumorale/leucémique. L'injection des différents anticorps monoclonaux sera réalisée selon la cinétique propre à chaque molécule à des temps précoces suivant la greffe.

Ensuite, afin de valider les stratégies thérapeutiques résultant des expériences utilisant des cellules de souris nous allons appliquer ces approches dans des modèles utilisant des cellules humaines du système immunitaire provenant de donneurs sains injectées dans des souris immunodéficientes. Pour évaluer l'effet anti-tumoral des traitements, des cellules provenant de lignées leucémiques humaines seront injectées aux souris immunodéficientes.

Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien être. Les animaux seront notamment anesthésiés sous isoflurane lors de l'injection des cellules par voie intraveineuse.

De plus, les expériences de maladie du greffon contre l'hôte chez les souris nécessitent un suivi quotidien des animaux notamment avec l'établissement d'un score pathologique (1-5, 5 étant le plus sévère) qui nous assure du bien être des animaux et du sacrifice en fonction de la sévérité de la maladie (score de 5).

Afin de réduire le nombre d'expériences dans ce modèle, seules les approches décrites précédemment dans les modèles souris-souris qui auront donné des résultats positifs et encourageants seront testées en utilisant des cellules humaines dans les souris immunodéficientes. Afin d'affiner les traitements, les molécules à tester seront tout d'abord utilisées *in vitro* notamment pour déterminer leur effet sur les cellules immunitaires soit à partir de rate et ganglions provenant d'animaux non-manipulés ou bien sur les cellules humaines issues du sang périphérique. De plus, pour certaines molécules dont nous voulons tester l'effet, certaines données de la littérature nous serviront de base pour la mise en place du traitement.

Pour l'ensemble de ce projet nous allons utiliser 5000 animaux sur 5 ans.

Retombées scientifiques :

Grâce à ce travail, nous espérons avoir une meilleure connaissance de la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte et de pouvoir proposer, grâce aux résultats obtenus dans ce modèle murin pré-clinique, de nouvelles approches permettant de mieux contrôler cette pathologie.

**9161** L'état de choc hémorragique, première cause de décès chez les moins de 44 ans, est une entité médicale complexe de par l'étiologie de cette hémorragie. Il est caractérisé par une chute du volume sanguin (perte d'au moins 30% de la volémie) induisant une altération de la perfusion tissulaire systémique et une baisse des apports en oxygène. Cette hypolémie si elle n'est pas corrigée conduit à un syndrome de défaillance multi-viscérale.

L'expansion volémique est le seul traitement pour maintenir la perfusion des organes et le retour veineux. L'objectif est d'assurer la survie du patient jusqu'à l'hémostase définitive et d'éviter les complications du choc hémorragique. Un premier bilan est établi grâce à des examens biologiques (bilan hématologique, un bilan rénal, gaz du sang) et radiographiques. Cependant, l'hypovolémie étant plurifactorielle, la stabilité hémodynamique des patients est très difficile à maintenir. Il est donc nécessaire de développer des traitements permettant d'atténuer les conséquences du choc hypovolémique.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'effet d'une nouvelle approche thérapeutique dans une situation de défaillance multiviscérale par choc hypovolémique avec l'administration d'un gaz rare : l'Argon (Ar). En effet, dans des travaux précédents du laboratoire, l'Argon a permis d'induire, une amélioration de la fonction cardiovasculaire et rénale dans un modèle de défaillance multiviscérale par ischémie-reperfusion abdominale. Dans ce présent projet, nous proposons d'évaluer l'Argon dans un modèle de choc hémorragique.

Dans ce but, nous utiliserons un modèle original de défaillance multiviscérale par choc hémorragique hypovolémique chez le lapin. Le laboratoire a en effet acquis une expertise particulière dans la recherche sur l'état de choc et ses conséquences dans cette espèce. Afin d'évaluer la fenêtre de protection de l'Argon, différents temps d'inhalation au cours du choc hypovolémique seront étudiés. Nous proposons d'étudier 3 groupes expérimentaux de 10 animaux chacun. Cette situation ne peut pas être mimée in vitro et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Les agressions ischémiques systémiques sont en effet des situations complexes impliquant de nombreuses interactions multiviscérales. Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires et les animaux seront maintenus sous anesthésie générale pendant toute la procédure (Raffinement). Nous utiliserons 35 animaux au total.

**9162** En France, le nombre de décès dus à un arrêt cardiaque extra-hospitalier est de l'ordre de 40 000 cas /an, ce qui représente la deuxième cause de décès après le cancer. Ces décès sont principalement liés à un arrêt cardiaque provoqué par un infarctus du myocarde sous-jacent. Dans ce cas, seulement 7% des patients survivent sans séquelles neurologiques. Chez certains patients, la reprise d'une activité cardiaque est même impossible avec les soins habituels de réanimation, on parle alors d'arrêt cardiaque réfractaire. Dans cette situation, il est proposé de recourir à des soins plus avancés tels que l'assistance circulatoire extra-corporelle (ACE), qui permet d'assurer une perfusion et une oxygénation des organes au cours de la réanimation. La fonction respiratoire est alors assurée par une ventilation mécanique conventionnelle. Cependant, la technique par ACE ne permet pas de déjouer les conséquences du syndrome post-arrêt cardiaque, en particulier la dysfonction cardiaque et la réponse inflammatoire. Il est donc pertinent de rechercher des approches complémentaires qui pourront ajouter leur bénéfice, notamment sur la réponse inflammatoire, à ceux de l'ACE. Dans ce contexte, le laboratoire a préalablement montré qu'une approche possible pour exercer des effets anti-ischémiques était l'administration d'Argon (par inhalation) dans un modèle d'ischémie-reperfusion abdominale développé au laboratoire. Dans le présent projet, notre but est de déterminer si l'Argon peut améliorer la fonction cardiaque et atténuer l'inflammation dans un modèle d'arrêt cardiaque réfractaire chez des porcs traités par ACE. Nous prévoyons d'inclure 2 groupes expérimentaux de 10 porcs chacun. Pour ce type d'étude, il est indispensable de recourir à des animaux compte tenu de l'aspect intégratif de cette situation et du traitement étudié. Le porc est l'espèce de référence pour la recherche sur l'arrêt cardiaque. Les agressions ischémiques systémiques sont des situations complexes impliquant de nombreuses interactions multiviscérales. Cette situation ne peut donc pas être mimée in vitro et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires ; les anesthésiques et analgésiques sont utilisées si besoin (Raffinement).

**9163** La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune générant la destruction des cellules bêta à insuline et provoquant une glycémie à jeun >1.26g/l de sucre par litre sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans les veines du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, nous avons développé une technique de transplantation dans l'omentum : le HOMING alliant biomatériaux et site d'implantation permettant de diminuer le nombre d'îlots de 25% en maintenant une normoglycémie. Le but de la présente étude est de tester l'impact de matrices/hydrogels (biocompatibles) définis sur la survie du greffon en condition HOMING, et de tester une diminution encore plus importante du nombre d'îlots nécessaires pour reverser le diabète. Pour cela, 6 hydrogels seuls ou fonctionnalisés seront testés et comparés à notre contrôle (HPMC supplémentés en plasma). Dans le cas où la réversion se révélerait meilleure, la quantité d'îlots sera diminuée pour une seconde étude voire une troisième avec un nombre d'îlots moindre. Nous avons choisi le modèle du rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Cette étude sera réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, greffés avec des îlots pancréatiques pour mimer le contexte clinique chez le patient humain. Réduction : Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (462 receveurs rats mâles Lewis pour 1476 donneurs). Raffinement : Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Les rats sont placés dans des cages de 1500cm<sup>2</sup>, en fonction de leur poids (jusqu'à 200g ils sont 6 par cage), entre 200 et 300g ils sont 5 et ensuite un rat est enlevé par tranche de 100g). Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Remplacement : Enfin, l'étude consiste à déterminer l'efficacité de biomatériaux sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique, ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

**9164** La transplantation hépatique est victime de son succès et doit faire face à une pénurie de greffons. Améliorer la qualité du greffon représente un moyen de favoriser son fonctionnement immédiat et aussi une façon de réduire la pénurie d'organes en autorisant l'accès à un pool de donneurs "non idéaux" comme les greffons stéatosiques, les greffons soumis à une période prolongée de conservation et les greffons des donneurs décédés par arrêt cardiaque (DDAC). La conservation par machine de perfusion représente un autre concept de conservation des greffons hépatiques qui apporte de nombreux avantages et offre l'opportunité d'augmenter avec plus de sécurité le nombre d'organes utilisables. Nous avons établi récemment une collaboration avec une équipe qui a mis au point une machine de perfusion transportable dédiée au foie. En utilisant un modèle de DDAC chez le porc, nous avons pu montrer un effet protecteur de cet appareil avec une meilleure survie des animaux à J5 (100% vs. 0%), une meilleure reprise de fonction immédiate, une diminution de la souffrance hépatocytaire et des lésions biliaires par rapport à des foies conservés en ischémie froide (IF). Cet effet bénéfique était associé à une diminution de la réponse inflammatoire, de l'apoptose, du stress oxydant et du stress du réticulum endoplasmique. L'objectif de ce projet est double i) évaluer l'efficacité du dispositif pour la conservation des foies stéatosiques et ii) évaluer ses performances pour une période prolongée de conservation. Méthodologie : Un modèle de transplantation hépatique chez le porc sera utilisé. Tache 1 : Evaluation du dispositif pour la conservation des foies stéatosiques. La stéatose chez les donneurs sera induite par administration IV de streptozotocine et régime hypercalorique pendant 5 semaines; Les foies prélevés seront conservés 4h à 4°C en ischémie froide ou par notre dispositif avant d'être transplantés.

Tache 2 : Evaluation du dispositif pour une période prolongée de conservation (20h). Les foies prélevés seront conservés 20h à 4°C en ischémie froide ou par le dispositif avant d'être transplantés. Le critère de jugement principal sera le taux de survie des animaux receveurs au 5ème jour post-transplantation et le taux de non fonction primaire. Les critères secondaires de jugement incluront l'incidence du syndrome post-reperfusion, la fonction hépatique, une analyse histologique ainsi qu'une analyse biochimique et moléculaire des lésions d'ischémie-reperfusion. Les paramètres seront analysés avant (ex-vivo) et après implantation (monitoring journalier des animaux) à la fois sur des échantillons de perfusât (flush-out), sanguins et tissulaires. Des paramètres habituels d'évaluation des lésions hépatocellulaires, endothéliales et mitochondriales seront analysés. Les mécanismes sous-tendant l'effet protecteur du dispositif seront évalués à travers l'analyse de la réponse inflammatoire, du stress oxydant, de l'apoptose, du métabolisme énergétique, et du stress du réticulum endoplasmique.

Résultats attendus et perspectives : Ce travail devrait confirmer la supériorité de notre dispositif sur l'ischémie froide pour la conservation des greffons stéatosiques et montrer aussi qu'elle autorise des durées de conservation prolongées en toute sécurité; en clinique, un tel dispositif pourrait permettre d'élargir l'accès au pool des donneurs « non idéaux ». En cas de résultats probants, nous envisageons de tester cette machine en situation clinique à travers une étude pilote.

Ce type de validation d'un dispositif médical ne peut être réalisé que en se mettant dans les conditions les plus proches possibles de son utilisation en clinique : en dépit des essais ayant déjà démontré une meilleure conservation du foie avec notre équipement que par les méthodes standard, les réactions de l'organe greffé et de l'organisme receveur sont trop complexes pour que l'utilisation chez l'homme soit éthiquement envisageable sans vérification chez l'animal de l'ensemble de la procédure. Dans ce projet, nous prévoyons d'utiliser 6 porcs greffés (et 6 donneurs) pour chacun des 5 groupes ce qui est le strict minimum pour que les résultats obtenus aient une validité scientifique soit 60 animaux au total. Les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne avant la greffe et seront suivis au minimum trois fois par jour ensuite. Tous les animaux greffés recevront des traitements morphiniques post-opératoires similaires à ceux utilisés chez les patients humains.

**9165** Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation des cas d'asthme allergique dans les pays industrialisés. Environ 300 millions d'individus seraient affectés. C'est une maladie inflammatoire chronique particulièrement invalidante conduisant à l'essoufflement du patient. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans la pathologie.

Notre objectif est d'évaluer l'effet de la délétion du gène codant pour le récepteur du mannose, impliqué dans les réponses inflammatoires, dans un modèle d'asthme allergique chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale répond aux administrations d'allergène par une réponse inflammatoire de type allergique des voies aériennes qui permet l'étude des cibles thérapeutiques. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier une réaction allergique de type asthmatique. Pour cette raison, une approche in vivo est nécessaire pour valider l'intérêt de la cible.

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. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 3 à 4, dans des cages 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, de 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 pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu 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 de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir une inflammation reproductible avec 8 souris par groupe. Il est prévu de mesurer l'effet de la délétion dans 3 modèles d'asthme dans lesquels l'expression du gène semble être différente. En préambule à la réalisation de ces modèles, une première étude sera menée sur 18 souris.

Nous envisageons donc l'utilisation de 18 animaux suivis, en cas de validation, par la réalisation des 3 modèles (3x48 souris), soit un maximum de 162 souris sur une période de 2 ans.

**9166** L'anesthésie générale représente un acte très fréquent dans la pratique vétérinaire courante chez les animaux de compagnie. Malgré les progrès récents du point de vue de la sécurité d'emploi des molécules ainsi que de la surveillance de la procédure anesthésique, cet acte reste aujourd'hui associé à un taux de mortalité relativement élevé par rapport à la médecine humaine (0,1-0.2 % chez le chien). Cette mortalité survient parfois au cours de soins relativement courants (soins dentaire, stérilisation, etc.) et est alors difficilement acceptable pour les propriétaires. Les accidents anesthésiques sont généralement liés à une condition physiopathologique particulière de l'animal qui entraîne une dépression importante des fonctions cardiovasculaires et neurologique en réponse à l'administration de la molécule anesthésique. À l'heure actuelle il n'existe cependant pas de molécules permettant d'antagoniser non spécifiquement les effets d'une molécule anesthésique dans le cadre d'une sensibilité particulière ou de surdosage accidentel.

Les administrations intraveineuses d'émulsions lipidiques ont été développées au cours des années soixante chez l'Homme pour la nutrition intraveineuse. Il s'agit d'émulsions composées d'acides gras à chaîne moyenne et longue. En 1998, il a été démontré que les émulsions lipidiques pouvaient être utilisées dans le traitement des intoxications par certains anesthésiques locaux. De la même façon, il a été démontré chez l'Homme que l'administration d'émulsions lipidiques pouvait être utilisée pour accélérer le réveil à la suite d'une anesthésie générale à l'isoflurane. Le mécanisme précis de fonctionnement des émulsions lipidiques est encore inconnu mais semble être lié à deux phénomènes distincts. D'une part, l'administration intraveineuse de lipides permettrait de capter la molécule toxique considérée, si elle présente une liposolubilité suffisante. D'autre part, les acides gras administrés pourraient jouer un rôle de support de la fonction cardiovasculaire selon un mécanisme encore inconnu. Ainsi, en réduisant la concentration de la molécule anesthésique dans le sang et en améliorant la fonction cardiovasculaire, les émulsions lipidiques pourraient être utilisées comme traitement non-spécifique en cas d'accident anesthésique.

Dans ce projet, nous proposons de réaliser une étude expérimentale de l'effet des émulsions lipidiques dans un modèle de dépression sévère de la fonction hémodynamique à la suite d'un surdosage anesthésique chez le lapin. Nous testerons deux protocoles anesthésiques différents. 30 lapins au total seront utilisés dans cette étude. Les lapins seront anesthésiés par administration de propofol ou par l'administration d'alfaxolone suivant les groupes. Une hypotension sévère sera ensuite provoquée par une surdose contrôlée de l'anesthésique utilisé. Pour chacun des protocoles anesthésiques, les animaux seront ensuite répartis aléatoirement entre un groupe recevant le traitement et un groupe recevant un placebo. Les animaux seront traités par l'administration intraveineuse d'émulsion lipidique (Intralipid 20%) afin d'évaluer l'effet de cette administration sur la pression artérielle, le débit cardiaque et la vitesse de réveil des animaux.

Cette situation ne peut pas être reproduite in vitro et il n'existe aucune méthode alternative d'évaluation de l'effet d'un anesthésique. La réponse à l'administration d'un anesthésique général est en effet une situation complexe qui implique de nombreux phénomènes pharmacocinétiques et pharmacodynamique ne pouvant être mimés simplement. Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible leur nombre (Réduction). Chaque expérience sera réalisée sous anesthésie générale et valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires. En accord avec le principe de raffinement, les expériences seront réalisées sous anesthésie et les animaux recevront une analgésie adaptée tout au long du protocole de façon à minimiser la douleur et le stress des animaux.

**9167** L'amélioration des traitements de maladies dues aux mycobactéries fait l'objet de recherches actives car certaines mycobactéries sont responsables de maladies graves, la plus connue étant la tuberculose, due à *Mycobacterium tuberculosis*. Le traitement standard de la tuberculose est long et difficile à mettre en place car il associe 4 antibiotiques pendant 6 mois. La longueur et la complexité du traitement ainsi le nombre croissant de souches résistantes sont des causes d'échec.

Notre projet vise à étudier l'activité d'antibiotiques ou d'associations d'antibiotiques contre *M. tuberculosis* in vivo afin d'améliorer l'efficacité du traitement en en réduisant la durée et/ ou la fréquence.

Les essais thérapeutiques de nouveaux antituberculeux chez l'homme sont très longs (environ 10 ans par essai) et sont limités par la variété des profils de résistance. Le modèle murin, utilisé depuis plus de 50 ans en chimiothérapie de la tuberculose permet de tester différentes hypothèses de traitement qui peuvent ensuite être confirmées chez l'homme voir même utilisées directement. Dans notre projet nous utiliserons donc le modèle murin. Cependant, même si le modèle de tuberculose est bien décrit dans la littérature chez certaines lignées de souris, la mise au point d'un nouveau modèle dans d'autres lignées pourrait s'avérer nécessaire afin d'étudier l'efficacité des nouveaux antibiotiques. Pour ce faire, nous estimons que sur la durée du projet au maximum 6 nouvelles lignées pourraient être utilisées pour la mise au point de nouveaux modèles, soit une utilisation de 108 animaux au maximum. En effet, en application de la règle des 3R et afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, 3 points d'euthanasie (le lendemain de l'infection, 15 et 30 jours après) de 6 animaux chacun ont été retenus pour estimer la mise en place d'une infection durable.

Une fois les modèles expérimentaux validés dans les nouvelles lignées, nous étudierons l'activité des antibiotiques in vivo contre *M. tuberculosis*.

La première étape sera l'étude de chaque nouvelle molécule par monothérapie. Le projet prévoit d'étudier au maximum 2 nouvelles molécules par expérience et 5 posologies, en comparaison à des animaux non traités et traités par un antibiotique de référence (isoniazide ou rifampicine). En application de la règle des 3R sur la réduction du nombre d'animaux, 10 souris par groupes sont nécessaires soit un total de 130 souris par expérience. Nous estimons que sur la durée du projet, 10 expériences de ce type seraient susceptibles d'être testées soit 1300 animaux.

La deuxième étape sera l'étude de l'activité d'associations d'antibiotiques. En effet, même si une nouvelle molécule ne peut être testée qu'en monothérapie afin d'évaluer son activité propre, la tuberculose nécessite d'être traitée par une association d'antibiotique afin de prévenir le risque de sélection de mutants résistants. Pour ce faire, après infection, 10 animaux sont euthanasiés le lendemain (charge bacillaire initiale) puis 20 quinze jours plus tard (charge bacillaire au début du traitement) En application de la règle des 3R, le nombre d'animaux dans ce groupe est supérieur car c'est à celui-ci que seront comparés tous les groupes tests, et il nécessite donc plus de puissance statistique. Pour chaque groupe traité, 10 animaux seront euthanasiés après 2,4 et 6 mois de traitement et 20 trois mois après l'arrêt du traitement afin de mesurer la proportion de rechute, soit 50 animaux par groupe. Nous estimons que 5 associations d'antibiotiques seront évaluées à chaque expérience en comparaison au traitement standard de référence. Sur la durée du projet 5 expériences maximum de ce type seraient menées soit un nombre d'animaux maximum de 1650.

Malgré l'utilisation d'associations d'antibiotiques, des souches résistantes peuvent apparaître. Le modèle murin permet de décrire la présence de ces souches avant traitement (par un test de fluctuation) et l'émergence sous traitement. Pour ce faire, des animaux sont laissés sans traitement et euthanasiés à différents temps une fois l'infection établie (n=50). Ceux-ci seront comparés à des animaux traités pendant 6 mois et euthanasiés tous les mois (n=60). En corrélation avec les nouvelles molécules testées, ce test de fluctuation pourrait être réalisé au maximum sur 10 expériences sur la durée du projet ce qui porterait le nombre d'animaux à 1100 au maximum.

Sur la durée totale du projet, 4158 animaux seront nécessaires au maximum.

Pour établir nos procédures, en plus d'une bibliographie approfondie sur le sujet, nous avons pris en compte la règle de 3R :

- Remplacement : le modèle murin utilisé pour *Mycobacterium tuberculosis* est le seul permettant une évaluation de l'activité des antibiotiques avant un essai chez l'homme. Il est dans ce cas impossible de remplacer l'expérience sur l'animal par une expérience in vitro ;



- Réduction : le nombre d'animaux proposé a été réduit au minimum indispensable nous permettant de répondre à la question posée après évaluation statistique et incluant le vieillissement normal des souris ;
- Raffinement : l'évolution de la maladie pouvant engendrer une souffrance chez l'animal une grille de suivi sera mise en place et des points limites adaptés seront définis afin de permettre de limiter au maximum le stress chez les animaux.

**9168** La sclérose en plaques (SEP) est une maladie de l'adulte jeune qui représente la première cause de handicap sévère non traumatique chez les trentenaires. Elle touche approximativement 80 000 personnes en France dont les trois quarts sont des femmes. Cette maladie est caractérisée par la destruction de la gaine de myéline entourant les axones des neurones au cours de poussées d'inflammation cérébrale. La SEP est donc connue comme étant une maladie inflammatoire de la substance blanche qui contient le plus de myéline. De nombreux éléments cliniques et radiologiques laissent cependant penser qu'il existe aussi une atteinte précoce de la substance grise (où se trouve le corps des neurones) avant même celle de la substance blanche.

Parmi les différents symptômes neurologiques induits par la SEP, l'altération de la mémoire (dépendante de l'hippocampe qui est une région particulière de substance grise) est fréquente et précède parfois l'apparition des autres déficits neurologiques. Cependant, il est impossible d'étudier les mécanismes biologiques qui conduisent à cette atteinte précoce chez l'homme chez qui on ne peut pas avoir accès au tissu lésé. Pour cela, nous utilisons un modèle de SEP chez la souris : l'encéphalite auto-immune expérimentale ou EAE. Les travaux précédents réalisés au laboratoire ont montré que les déficits précoces de la mémoire dans ce modèle de SEP sont dus à une altération des neurones dans une région particulière de l'hippocampe (le gyrus denté). Cette altération des neurones du gyrus denté est causée par les cellules immunitaires spécifiques du cerveau : les cellules microgliales.

La nouvelle question posée dans ce projet est de comprendre comment les cellules microgliales pathologiques (à cause de l'inflammation liée à la SEP) altèrent les neurones du gyrus denté. D'après les données de la littérature dans d'autres conditions que la SEP et d'après nos données du laboratoire, nous faisons l'hypothèse que les protéines du complément et notamment une protéine appelée C3 est impliquée dans l'interaction microglie – neurone conduisant à la perte de neurones du gyrus denté.

Pour identifier le rôle de cette protéine C3 dans notre modèle de SEP, nous souhaitons utiliser des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas la molécule C3 (Souris C3KO). Nous étudierons à la phase précoce de la maladie chez ces animaux les caractères suivants :

- l'intégrité de la mémoire via un test comportemental
- l'intégrité des tissus en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en microscopie après avoir marqué des cellules d'intérêt

Notre hypothèse est que les souris SEP n'exprimant pas le C3 (C3KO) auront de meilleures performances de mémoire et moins de perte de neurones que les souris exprimant le C3 ce qui confirmerait le rôle central de C3.

La règle des 3R sera appliquée de façon suivante :

Remplacement : il n'est pas possible pour l'heure de reproduire la complexité de la SEP avec des modèles in vitro. Il est donc nécessaire d'avoir recours à l'animal pour tester notre hypothèse.

Le modèle de sclérose en plaques chez la souris (EAE) est largement utilisé dans la littérature scientifique parce qu'il est celui qui reproduit au mieux les caractéristiques de la SEP retrouvées chez l'homme.

Réduction : Nous avons fixé une limite maximale à 60 souris C3KO et 30 souris de phénotype naturel C57Bl6/J (wild type) pour une période d'1 an soit un total de 90 animaux. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable.

Les retombées scientifiques principales de ce projet seront une meilleure compréhension du rôle de la molécule C3 à l'origine de l'altération neuronale dans l'hippocampe affectant la mémoire au stade précoce de la SEP. A terme, ce projet pourra donc permettre d'identifier de nouvelles cibles

moléculaires pour développer des traitements visant à protéger l'hippocampe et donc la mémoire des patients en ciblant le C3.

Raffinement : Des mesures de raffinements seront mises en place durant toute la durée du projet : les animaux seront hébergés au sein d'un établissement utilisateur agréé, dans des conditions d'hébergement favorisant leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien par du personnel qualifié, alimentation au sol ...). Les procédures se déroulent sous anesthésie (isoflurane), et sur tapis chauffant, avec soin post-opératoire incluant l'administration d'analgésiques si nécessaire. Enfin des points limites ont été établis (décrits paragraphe 3.4.13), entraînant l'euthanasie anticipée de la souris si nécessaire.

**9169** La Maladie hémorragique virale du lapin (Rabbit haemorrhagic disease, RHD) est une maladie infectieuse fulgurante souvent fatale (60 à 90 % de mortalité en 48-72 heures) qui affecte les lapins de chair, de compagnie et sauvages (lapins de garenne) de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*. Elle est provoquée par un calicivirus du genre *Lagovirus*. Mise en évidence pour la première fois en Chine en 1984, la RHD a rapidement diffusé en Europe et a causé d'importantes pertes économiques dans les élevages industriels de lapins atteints. Elle a également perturbé les écosystèmes naturels en Europe occidentale pour lesquels le lapin de garenne est une espèce clé. En 2010, un nouveau génotype, le RHDV2, a émergé en France et s'est rapidement propagé en Europe et hors d'Europe. Son échappement partiel à l'immunité induite par le RHDV ou les vaccins a eu pour conséquence la réémergence de la RHD en élevage. L'origine des formes pathogènes RHDV puis RHDV2 est à ce jour inconnue. Parallèlement, plusieurs génotypes de lagovirus non pathogènes co-circulent dans les populations de lapins et interagissent avec les souches pathogènes au travers notamment d'événements de recombinaison génomique. La recombinaison entre génomes viraux constitue une des forces importantes d'évolution pouvant conduire à l'émergence de formes pathogènes ou à l'augmentation de la virulence. A l'heure actuelle, il est encore impossible de produire les virus responsables de la RHD en infectant des cultures cellulaires (production *in vitro*). Les besoins de stocks viraux pour les travaux de recherche ainsi que les études visant à caractériser l'impact d'une infection virale (phénotypage) ne peuvent se réaliser qu'*in vivo* sur l'espèce hôte et dans des conditions expérimentales confinées. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire. Pour chaque procédure expérimentale, l'effectif en lapins sera défini statistiquement afin de correspondre au nombre minimum nécessaire pour répondre à la question scientifique posée. Le présent projet de cinq ans a pour objectifs 1) de multiplier et de phénotyper les souches de lagovirus pathogènes et non pathogènes d'intérêt, 2) d'étudier le rôle de la protéine de capsid virale dans la pathogénicité des lagovirus pour le lapin, ainsi que celui de motifs moléculaires détectés au niveau du génome, afin d'expliquer l'émergence de formes pathogènes et de mieux les prédire. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, la multiplication d'un virus sera couplée à son phénotypage si cette caractérisation est nécessaire. Pour la multiplication de virus pathogènes, au plus cinq lapins seront infectés par souche. Pour la multiplication de virus non pathogènes de même que pour les études de phénotypage de souches et de la pathogénicité des virus régénérés par génétique inverse, au plus 20 lapins seront infectés par virus étudié et en fonction des besoins statistiques. Les lapins seront hébergés en groupe dans des cages équipées de plateformes et bénéficieront d'un enrichissement avec des objets adaptés à l'espèce. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Le nombre total de lapins utilisés sur cinq ans, incluant les lapins des lots témoins non infectés, est estimé à 250 au maximum. L'évolution de la RHD et l'apparition des premiers cas de mortalité étant très rapide (2-3 jours post-infection), les animaux seront surveillés très régulièrement pendant la phase aigüe de la maladie (visites matin, midi et soir) afin de détecter une altération de leur état de santé et de procéder à leur euthanasie si les points limites que nous avons défini sont atteints.

**9170** Dans la majorité des troupeaux ovins, on trouve des agneaux orphelins ou délaissés par leur mère ainsi que des brebis prolifiques dont la lactation est insuffisante. Comme il est difficile de faire allaiter un agneau par une brebis qui n'est pas sa mère, l'allaitement artificiel est la solution de rigueur, les éleveurs remplaçant le lait de la mère par un aliment commercial distribué aux agneaux au moyen d'un nourrisseur. Le principal avantage de l'allaitement artificiel est la possibilité de sauver des

agneaux qui autrement sont voués à la mort. Cependant l'allaitement artificiel n'offre pas des gages de satisfaction en particulier les agneaux sont chétifs, présentent des diarrhées fréquentes et une mortalité plus élevée que chez les agneaux laissés avec leur mère. Récemment, un problème de surmortalité important (40-80 %) et parfois tardif (à 3 semaines d'âge) a été soulevé sans que les raisons en soient connues.

Nous proposons dans ce projet d'apporter au lait commercial des prébiotiques oligosaccharides qui favorisent l'implantation de communautés bactériennes primocolonisatrices pour prévenir les effets délétères de l'allaitement artificiel. Nous suivrons la santé des animaux et leur développement cérébral jusqu'à l'âge de 10 semaines. Celui-ci sera suivi par une méthode non invasive l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Cette étude respecte la règle des 3R :

Remplacement : Cette étude s'intéressant à l'adaptation de l'animal à l'allaitement artificiel, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude in vitro n'est envisageable.

Réduction : Vingt-quatre agneaux sont requis ce qui constitue un nombre minimum compte-tenu des aléas expérimentaux.

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour favoriser le bien-être des animaux notamment en préservant leur besoin d'être en contact avec leurs congénères (enrichissement social) et en leur apportant nourriture et soins ajustés à leur condition physiologique. De plus, les agneaux seront habitués à la manipulation humaine par un contact doux quotidien pendant une semaine. Les animaux seront habitués à la contention. De plus, les prises de sang seront effectuées par un personnel très compétent et de la pommade sera appliquée après la prise de sang pour décongestionner les tissus. Enfin toutes les séances d'imagerie se font sous anesthésie générale évitant ainsi toute souffrance.

**9171** Le projet a pour objectif de former les étudiants qui préparent un Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) dans la spécialité Génie Biologique aux bonnes pratiques de manipulations en expérimentation animale. Il s'agit ici d'enseignements pratiques de physiologie animale et de pharmacologie-toxicologie dispensés dans le cadre d'un diplôme professionnalisant qui a pour but de former des techniciens supérieurs polyvalents dans le domaine de la santé humaine et animale.

Dans ce contexte, les personnes qui valideront ce diplôme posséderont les compétences techniques pour intervenir en expérimentation animale, compétences qui leur sont demandées par les structures de recrutement et qui ne sont donc actuellement pas substituables par un autre enseignement (remplacement)

Ce diplôme donne par ailleurs accès au Diplôme Universitaire d'expérimentation animale de niveau 2 qui est exigé dans certains recrutements sur des supports de techniciens supérieurs dans les industries pharmaceutiques et laboratoires de recherche par exemple.

Dans le cadre des enseignements de Licence Professionnelle, les enseignements permettront de créer un modèle cellulaire à partir de prélèvements de tissus en allant de l'immunisation jusqu'à la caractérisation finale des cellules mises en culture.

Les rongeurs (environ 200 rats et 200 souris/an, nombre variable en fonction du nombre d'étudiants accueillis dans la formation) qui sont utilisés dans ce projet devront permettre aux étudiants de se familiariser avec la manipulation des animaux de laboratoire en menant leurs expérimentations dans le respect des règles de bioéthique en vigueur. Les étudiants sont pour ce faire suivis par un personnel enseignant compétent, lui-même formé aux bonnes pratiques en expérimentation animale. Les animaux sont hébergés et maintenus en groupe en fonction de leurs poids (3 à 5 rats dans des cages de 1500 cm<sup>2</sup>, 3 à 6 souris dans des cages de 500 cm<sup>2</sup>). Un enrichissement du milieu des animaux est réalisé avec des bûchettes et tunnel en polycarbonate pour les rats, du "sizzle-nest" (bandes de papier kraft) et tubes en carton pour les souris (raffinement). Ils sont surveillés quotidiennement (y compris week-end et jours fériés)

Dans un souci de formation par la pratique, mais soucieux des règles de restriction relatives à l'utilisation des animaux de laboratoire, un animal est prévu par étudiant ou par binôme d'étudiants en fonction de la nature de l'expérimentation (réduction). A travers ces travaux pratiques, les étudiants apprennent à mettre en œuvre les principales techniques expérimentales utilisées en

physiologie animale sur animaux vivants et/ou organes isolés. Ils sont dans ce sens évalués de façon pratique à l'issue de chaque module d'enseignement par les enseignants responsables des travaux pratiques.

- 9172** La connaissance actuelle des maladies cardiovasculaires fait la part belle aux processus biologiques tels que l'inflammation et l'immunité à toutes les étapes de leur développement. Le système immunitaire et l'inflammation participent directement à l'initiation et la progression de l'athérosclérose et la thrombose. La thrombose se définit par la formation d'un thrombus obturant un vaisseau sanguin. Dans un contexte d'athérosclérose, la thrombose artérielle peut être déclenchée par une lésion de la paroi d'une artère entraînant la formation d'un caillot au contact de la zone de l'artère lésée. Lorsque le thrombus envahit la circulation artérielle, il entraîne une occlusion artérielle avec ischémie voire infarctus des tissus irrigués par le vaisseau lésé. Les embolies, fragments du thrombus se détachant du caillot entraînent fréquemment embolie pulmonaire ou accident vasculaire cérébral. Classiquement, on reconnaît le rôle des leucocytes et des cellules vasculaires dans les pathologies cardiovasculaires. Cependant, un nombre croissant de données mettent en évidence que la plaquette sanguine pourrait aussi avoir un rôle important dans la modulation des réponses immunitaires et inflammatoires. Cependant comment la plaquette remplit ces fonctions reste une énigme. Cela inclut vraisemblablement, l'expression et/ou la sécrétion de cytokines et de chimiokines ainsi que des récepteurs membranaires permettant un dialogue avec les cellules immunitaires. Nous avons émis l'hypothèse que ces fonctions modulatrices de l'inflammation et de l'immunité jouées par les plaquettes impliquent la molécule de co-stimulation (LIGHT). Ce projet a pour objectif d'évaluer l'implication de LIGHT dans la régulation des réponses immunitaire et inflammatoire au cours de l'athérosclérose et la thrombose artérielle. Pour se rapprocher de la pathologie humaine, nous utiliserons un modèle de thrombose suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose chez la souris athéroscléreuse ApoE ko en présence ou en absence de LIGHT. Ce projet a pour objectif de déterminer si l'inhibition de LIGHT peut prévenir/réduire la thrombose sur plaque d'athérome rompue, qui est la cause principale d'infarctus du myocarde, d'embolie pulmonaire et d'AVC ischémiques.
- Réduire : Nous émettons l'hypothèse que l'absence de LIGHT joue un rôle significatif sur le développement du thrombus si nous observons une réduction d'au moins 30% de l'aire moyenne du thrombus formé chez les souris double ko ApoE/LIGHT par rapport au groupe ApoE ko. En tenant compte de cette hypothèse, nous avons réalisé une estimation de la taille des effectifs à l'aide du logiciel : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. Le calcul de puissance a déterminé une taille d'échantillon de 8 individus par groupe.
- Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées : Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour afin d'évaluer les signes de souffrance et de détresse et ainsi respecter les points limites que nous avons fixés. L'établissement d'expérimentation a mis en place un enrichissement du milieu. Toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés.
- Remplacer : Le développement de la plaque d'athérome est un processus lent qui résulte de dysfonction du métabolisme lipidique associé à des altérations de la paroi vasculaire et une activation du système immunitaire. La complexité des mécanismes physiopathologiques rend impossible la modélisation in vitro et le remplacement par des études sur cellules.
- L'ensemble de ces expériences nécessitera 16 souris.

- 9173** L'adénocarcinome du pancréas humain (PDAC) est l'un des cancers les plus redoutables et meurtriers dans le monde. Il représentait la quatrième cause de décès par cancer au niveau mondial en 2012. En l'absence de progrès dans sa prise en charge, les données actuelles prédisent que le PDAC sera la seconde cause de mortalité par cancer en 2030. Le taux de survie ne dépasse pas 20% à 1 an et 3% à 5 ans avec une moyenne de survie de 3 à 4 mois après le diagnostic. Il fait l'objet d'un diagnostic tardif et présente une évolution très rapide principalement due à la formation de métastases. A ce jour, aucune thérapie efficace du cancer du pancréas exocrine, qui demeure peu sensible à la chimiothérapie et à la radiothérapie, n'est disponible. L'utilisation du protocole Folfirinox (chimiothérapie composée de 4 médicaments : oxaliplatine, irinotécan, 5-fluorouracile et acide

folinique), accessible qu'à un certain nombre de patients présentant un état physique satisfaisant, augmenterait sensiblement le taux de survie des patients mais, malheureusement, ne permet pas encore leurs guérisons. Depuis quelques années, de nouveaux concepts voient le jour, fondés sur la combinaison de plusieurs stratégies telles que la chimiothérapie associée à l'immunothérapie. Dans le modèle murin, la vaccination anti-tumorale par des cellules dendritiques (DC) s'est avérée efficace. L'émergence de ces nouvelles stratégies thérapeutiques permettraient la mise en place à terme de traitements plus efficaces afin d'augmenter les chances de survie des patients.

Objectif du projet : Dans un modèle expérimental de cancer du pancréas de souris génétiquement modifiées [Pdx1-cre/KrasG12D/Ink4AF/F ; expression du gène Kras muté et suppression du gène suppresseur de tumeur Ink4A], il sera évalué l'efficacité thérapeutique d'un protocole de chimiothérapie Folfirinox combiné à un protocole de vaccination anti-tumorale, fondée sur l'utilisation de DC pour activer une réponse immunitaire contre la tumeur et permettre ainsi une optimisation des effets thérapeutiques.

Avantages du modèle et dommages attendus pour l'animal : Ce modèle animal qui développe de manière spontanée un cancer du pancréas va nous permettre (1) de reproduire les caractéristiques de l'environnement tumoral et immunitaire sous protocole Folfirinox, reflétant ainsi ce qui peut se passer chez les patients, (2) de déterminer l'efficacité de la combinaison thérapeutique Folfirinox-Immunothérapie, et (3) de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans une réponse immunitaire anti-tumorale afin d'optimiser la réponse thérapeutique.

Nombre total d'animaux utilisés : il sera de 68 souris génétiquement modifiées. Cette procédure expérimentale sera réalisée sur 28 souris réparties en 4 groupes de 7 plus 6 donneurs de moelle osseuse et reproduite une fois pour obtenir des valeurs statistiques ( $34 \times 2 = 68$  souris).

Conformité avec les exigences des 3R :

1. Réduction : Dans le souci de réduire la quantité d'animaux, le nombre par groupe a été minimisé. Il se justifie par le fait d'avoir assez de matériels cellulaires pour réaliser les différentes expériences in vitro et d'avoir un nombre suffisant pour gommer les différences inter-individus et obtenir des résultats statistiquement exploitables (utilisation du test non-paramétrique de Mann-Witney).

2. Remplacement : Ce modèle de souris génétiquement modifiées ne peut être remplacé car (1) il développe un cancer du pancréas de manière spontanée, puis il va nous permettre (2) de déterminer l'efficacité thérapeutique de la combinaison Folfirinox-immunothérapie en suivant le développement tumoral, (3) d'étudier les populations de cellules du système immunitaire mise en place pour combattre la tumeur suite à ce traitement.

3. Raffinement : Les critères de raffinement suivants seront appliqués :

- Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et la nourriture.
- Les animaux seront toujours répartis par groupe de 3 ou 4 par cage à laquelle sera ajouté de l'enrichissement (cylindres et bâtonnets de cartons stériles, coton, nids plastiques stériles ...).
- Durant la période de traitement Folfirinox et/ou de vaccination anti-tumoral, le développement de la tumeur sera suivi par mesure du poids de l'animal (pesée bi-hebdomadaire) (la cachexie est un indicateur du développement tumoral). Afin d'éviter tout développement d'une souffrance animale, les animaux seront euthanasiés dès que la perte de poids atteindra 20% du poids initial de l'animal (point limite).
- Les signes comportementaux seront aussi surveillés durant cette période de croissance tumorale et d'application du traitement pour éviter une éventuelle souffrance animale. Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée selon les critères suivants :
  - Comportement (observation quotidienne) : dynamisme et postures de l'animal (postures générale et faciale, comportement exploratoire).
  - Apparence physique externe (observation quotidienne) : blessure, morsures, et sur un plan général (déshydratation, abdomen creux ou anormalement distendu, troubles urinaires ou défécatoires, consistance et quantité des selles).
- Si un comportement de souffrance, déterminé selon la grille d'évaluation (valeurs situées entre 4 et 6 ; les valeurs situées entre 0 et 3 reflètent des modifications mineures du comportement sans douleur associée), est observé durant cette période, un antalgique (buprénorphine 0,05-0,1 mg/kg en s.c) sera administré associé à l'arrêt du traitement. Si les signes persistent au-delà de 4 jours ou si le score dépasse 6, l'arrêt de l'expérimentation sera réalisée immédiatement par euthanasie de l'animal.

- Les euthanasies seront réalisées par dislocation cervicale sous anesthésie générale dans une pièce d'expérimentation isolée des pièces d'hébergements et de ses congénères.

**9174** Le récepteur de la ryanodine est une protéine essentielle à la contraction musculaire, et son absence totale conduit à la létalité dans les premières heures post-natales chez la souris. Chez l'homme, l'absence totale de protéine n'a jamais été décrite, mais une réduction de la quantité de protéine en dessous de 50% conduit à une myopathie dont la sévérité semble proportionnelle à la quantité de protéine manquante.

Nous avons développé un nouveau modèle de souris chez lequel l'extinction du gène du récepteur de la ryanodine (RYR1) est induite uniquement dans les muscles après injection d'un agent inducteur. En conséquence, l'expression de la protéine et la force sont réduites. Cette lignée de souris constitue donc un bon modèle animal de la myopathie à cores humaine.

A ce jour, la prise en charge des patients se réduit à de la kinésithérapie et de la corticothérapie ce qui améliore leur état général, en l'absence de tout traitement curatif. Le propos de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de différents agents.

Nous avons identifié 10 agents candidats dans la littérature ou au travers des travaux du laboratoire. Nous avons privilégié au cours de cette sélection les agents déjà utilisés en clinique pour d'autres pathologies (repositionnement) ou en essai clinique afin d'optimiser la possibilité de transférer nos résultats en clinique. Leur évaluation nécessitera au maximum 1160 souris.

Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; un suivi quotidien de leur bien-être sera assuré.

L'ensemble de ces agents seront d'abord éprouvés *in vitro*. Ce crible permet de réduire considérablement le nombre de souris nécessaires.

Nous connaissons bien le modèle sur lequel nous travaillons, et notamment en ce qui concerne les points limites que nous avons définis.

Enfin, le nombre d'animaux par groupes et le nombre de répétitions des expériences sont ajustés pour optimiser l'interprétation statistiques des informations.

**9175** La technologie des ultrasons focalisés, désignée par l'acronyme HIFU (pour « High Intensity Focused Ultrasound »), 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. Cette concentration d'énergie provoque localement une élévation de température qui induit la destruction du tissu ciblé. 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.

Pour le traitement par HIFU des nodules thyroïdiens et des fibroadénomes du sein nous avons développé un dispositif qui est utilisé en clinique dans plusieurs pays. Nos essais antérieurs ont notamment permis d'obtenir l'autorisation de procéder à des essais cliniques aux Etats-Unis.

Dans le cadre du traitement des varices, notre dispositif permettrait de remplacer les techniques chirurgicales ou les méthodes endo-veineuses par un geste non invasif. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention réduites et par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, procédure ambulatoire ...). 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).

En particulier, l'utilisation d'une méthode non-invasive permettrait le traitement des veines perforantes incompétentes. Les patients pour qui la maladie a évolué vers ce stade sont susceptibles de développer des ulcères et, dans ce contexte précis, la réalisation d'incision ou d'injection dans la zone est dangereuse car elle peut engendrer des complications importantes.

De plus, l'insuffisance veineuse est une pathologie chronique et le taux de récurrence est très élevé, de l'ordre de 50% après quelques années. Or, il est très délicat de retraiter une zone ayant subi une chirurgie, puisque la cicatrisation des tissus rend l'abord extrêmement difficile. Une solution non-invasive est donc intrinsèquement adaptée au traitement des cas mentionnés ci-dessus et son développement répond à une réelle problématique clinique.

Objectif général. Notre but est d'évaluer l'efficacité de notre dispositif de traitement HIFU pour l'occlusion des veines dans le contexte du traitement des varices.

les essais ex-vivo ne permettent pas d'obtenir des résultats pertinents. En effet, la circulation du sang dans la veine est un élément essentiel puisqu'elle refroidit la paroi veineuse et tend donc à diminuer l'efficacité du traitement. Par conséquent, il est impératif de traiter sur un sujet vivant.

Modèle animal et méthode : Des traitements HIFU seront délivrés sur les veines fémorales de brebis. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet. Ces veines sont accessibles pour les ultrasons puisqu'aucun milieu réfléchissant (os, air.) ne se trouve dans le faisceau. Il est nécessaire de traverser des tissus superficiels, ce qui correspond à la situation observée chez l'humain. De plus, son diamètre, de l'ordre de 5 mm, est suffisamment important pour se rapprocher de cas humains. Les brebis seront anesthésiées et l'énergie HIFU sera appliquée par voie externe. Après traitement, les brebis seront réveillées pour que le processus d'occlusion, dont la durée est de l'ordre de quelques semaines, puisse avoir lieu. Après leur réveil, elles seront placées sous analgésique. Les animaux seront ensuite maintenus en vie pendant une durée allant de deux à seize semaines. Le jour de l'euthanasie programmée, les brebis seront placées sous anesthésie et un examen Doppler des veines traitées sera réalisé. Les veines seront prélevées post mortem pour analyse histologique.

L'intervalle de durée allant jusqu'à seize semaines est justifié par la nécessité de prouver la durabilité de l'occlusion, qui peut être mise en péril par les processus naturels de recanalisation. Cependant, tous les animaux ne seront pas maintenus en vie durant une durée si longue. En particulier, les premiers animaux traités seront maintenus en vie pendant une durée plus courte (typiquement de 2 à 4 semaines) afin de vérifier les effets du traitement. Une fois la preuve de concept effectuée sur ces premiers animaux, la durabilité de l'occlusion sera évaluée sur une période plus longue sur d'autres animaux. Dans le but de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de l'étude, si une occlusion satisfaisante est constatée lors de l'examen Doppler le jour de l'euthanasie programmée, la durée de suivi pourra être prolongée une fois (dans la limite d'une durée totale n'excédant pas 16 semaines). L'animal sera alors réveillé et le jour de l'euthanasie sera repoussé. Cette possibilité permettra d'éviter d'euthanasier un animal alors que les résultats au Doppler sont suffisamment bons pour conclure à une occlusion et que l'euthanasie peut être repoussée pour évaluer la durabilité de l'occlusion sur le même animal.

De plus, Les premiers résultats sur l'animal ayant démontré l'efficacité du traitement sur de plus petites veines, nous souhaitons nous projeter également vers des problématiques de sécurité du traitement. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour nos investigations, le jour de l'euthanasie effective, une procédure sans réveil sera effectuée sur les brebis anesthésiées. Un thermocouple sera inséré au voisinage d'une veine non traitée et des tirs HIFU seront délivrés sur la veine. Le but est de mesurer l'élévation de température dans les tissus environnant la veine en fonction de la puissance de tir et du flux sanguin mesuré en Doppler. Ceci permettra de collecter des données préliminaires sur les distances de sécurité vis-à-vis des structures sensibles à envisager pour la procédure clinique. Le but est ainsi de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans nos protocoles futurs de détermination des marges de sécurité.

Trente brebis seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

- 9176** L'obésité, étant associée à de nombreuses pathologies graves (diabète de type II, atteintes vasculaires, hypertension, maladies neurodégénératives, certains cancers), constitue sans conteste un des principaux challenges de santé publique du XXIème siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses (notamment en acides gras saturés) explique, en partie, ce phénomène. Notre équipe a récemment montré chez la souris qu'il existait un système de détection oro-sensoriel des lipides alimentaires dans lequel le lipido-récepteur CD36 serait impliqué en modulant la sélection et la digestion des aliments riches en graisses. Ces données inédites suggèrent l'existence d'une 6ème modalité gustative : le « goût du gras ».

Nos travaux récents chez la souris rendue obèse par un régime hyper gras indiquent que ces animaux détectent moins bien les lipides alimentaires, en raison d'une dérégulation du système de détection des lipides au niveau des papilles gustatives. A ce jour les mécanismes responsables de cette dérégulation ne sont pas connus. Nos travaux chez l'Homme ont mis en évidence que les sujets ne détectant pas correctement les lipides étaient tous obèses et surconsommaient des aliments gras. Nous formulons l'hypothèse que l'augmentation de masse grasse corporelle induite par un régime obésogène affecte le bon fonctionnement des papilles gustatives. En effet, nous avons montré chez la souris qu'il existe une corrélation inverse entre la masse grasse et la sensibilité de la détection orosensorielle des lipides alimentaires. Par ailleurs, on sait également que la chirurgie bariatrique visant à réduire le volume de l'estomac entraîne une perte importante de poids chez le rat et chez l'Homme, mais également des modifications comportementales entraînant une diminution de la consommation d'aliments gras.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact d'une perte de poids induite par 2 types de chirurgie bariatrique (gastroplastie ou court-circuit gastriques) sur la perception gustative de souris rendues obèses par un régime hypergras et d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :

Le remplacement n'est pas envisageable, compte tenu du contexte scientifique (étude du goût) et du contexte expérimental (chirurgie/impact d'un régime alimentaire) rendant le recours au modèle animal indispensable.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum à l'aide d'outils d'optimisation statistique. Un nombre total de 132 animaux sera toutefois nécessaire, ce nombre tenant compte du pourcentage de réussite des méthodes de chirurgie utilisées.

En ce qui concerne le raffinement, nous avons choisi la souris car cette espèce est la plus pertinente dans l'étude du comportement alimentaire en raison de sa préférence spontanée pour les lipides. Afin de garantir leur bien-être lors de cette expérience, les animaux seront hébergés avec un enrichissement approprié (frisottis de carton et buchettes de bois à ronger) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. De plus, un nombre restreint de personnes interviendront afin de limiter le stress des animaux. Ce personnel dispose d'une formation adéquate et est compétent pour détecter précocement l'un des points limites définis pour ce projet.

**9177** Le vieillissement normal du cerveau s'accompagne d'un déclin de la neurogénèse adulte, de la plasticité neuronale et des fonctions cognitives. Ces modifications commencent à se développer autour de 65 ans et l'une des régions cérébrales les plus affectées est l'hippocampe, ce qui conduit à des déficits d'apprentissage et à un déclin de la mémoire.

Avec l'accroissement de l'espérance de vie, le nombre de personnes touchées par une perte des fonctions mnésiques liée à l'âge est inexorablement appelé à augmenter dans les prochaines décennies. Par conséquent, une meilleure compréhension de la façon dont notre cerveau vieillit et l'identification des mécanismes cellulaires permettant le maintien de nos fonctions mentales, pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir le déclin et/ou restaurer la résilience de notre santé mentale durant le vieillissement.

Plusieurs rapports indiquent que le niveau des gènes de l'autophagie, c'est-à-dire le phénomène de nettoyage des cellules, diminue dans le cerveau durant le vieillissement. Des études réalisées chez le petit ver *C. elegans* et la mouche *Drosophile* suggèrent que l'autophagie pourrait contribuer à la croissance et à la plasticité synaptique des neurones. Ces observations et le fait que la formation de nouvelle mémoire requiert de profonds changements dans la composition des protéines et des organelles au sein des neurones hippocampiques, nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'autophagie pourrait avoir un rôle physiologique dans la régulation de la mémoire, en conditions normales et durant le vieillissement.

L'expérimentation *in vitro* ne permet pas de répondre à toutes les questions. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier ce phénomène en conditions physiologiques et physiopathologiques et d'observer les effets de l'inactivation de notre gène d'intérêt dans son ensemble.

Nous utiliserons des souris de 8 semaines, 3 mois et 16 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaire sera de 850. Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées



sera réduit à son minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés.

Différents produits activateurs ou inhibiteurs des gènes de l'autophagie seront injectés dans l'hippocampe des souris avant de les soumettre à différents tests comportementaux. La chirurgie aura lieu sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en post-opératoire.

Pour assurer le bien-être des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Les souris seront sous surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

En résumé, ce projet pourrait permettre d'identifier un nouveau rôle physiologique de l'autophagie dans le cerveau et conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour restaurer/prévenir les effets délétères du vieillissement sur le cerveau.

**9178** Les cancers sont caractérisés par une prolifération incontrôlée de cellules tumorales. Les globules blancs jouent un rôle majeur dans le contrôle de cette prolifération. Les lentivirus sont particulièrement intéressants pour une approche vaccinale thérapeutique dans le domaine de l'oncologie car ils permettent d'activer ces globules blancs.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de vaccins thérapeutiques dans le but de stimuler et orienter la réponse immunitaire et d'éliminer les cellules tumorales. En effet, l'existence de protéines spécifiques présentes uniquement dans les cellules tumorales permet de cibler les tumeurs. La vaccination avec des lentivirus permettrait ainsi d'induire des cellules spécifiques de ces protéines de tumeurs et capables de tuer les cellules tumorales. La tumeur pourrait ainsi être éliminée par les cellules induites par la vaccination.

Le bénéfice attendu de ce projet est le développement de vaccins thérapeutiques en oncologie humaine et plus particulièrement dans les cas de cancers induits par le papillomavirus, le cancer de la prostate, le cancer de la vessie et le cancer du côlon. Avant d'envisager leur utilisation chez l'homme, nous devons d'abord établir la faisabilité de cette technique dans un organisme vivant en caractérisant les réponses immunitaires et anti tumorales induites par la vaccination. Ces réponses doivent être évaluées dans un organisme vivant du fait de la complexité des phénomènes impliqués. Les expériences de ce projet consistent à implanter une tumeur solide dans une série d'animaux, pour cela, des cellules tumorales seront injectées par voie sous cutanée puis se multiplieront pour former une tumeur solide en quelques jours. Une partie de ces animaux sera traitée avec les lentivirus porteurs de l'antigène vaccinal, une seconde partie avec un lentivirus contrôle (un vaccin sans les gènes tumoraux) alors qu'une troisième série reste non traitée. La croissance tumorale est alors suivie par des mesures régulières de la taille de la tumeur. Pour évaluer l'activation du système immunitaire, les animaux seront euthanasiés à différents temps après l'implantation tumorale et la vaccination et les organes (rate, ganglions et tumeur) seront prélevés et analysés. Plusieurs conditions seront testées dans ce projet pour optimiser le protocole de vaccination en utilisant des combinaisons avec des réactifs qui permettent d'augmenter les réponses immunitaires. La dernière étape de ce projet sera de tester le traitement optimisé sur des tumeurs de grosse taille, réputées pour être plus résistantes aux traitements. Il est d'une grande importance de développer des traitements efficaces dans ces phases tardives des cancers.

Dans le respect de la règle des 3R, les conditions à tester lors des expériences seront déterminées par des expériences réalisées *in vitro* (Remplacer), le nombre d'animaux utilisé sera réduit tout en conservant un minimum permettant d'obtenir des résultats significatifs (Réduire). Le nombre d'animaux à utiliser sera déterminé avec l'aide d'un biostatisticien et des tests statistiques de type ANOVA seront réalisés pour déterminer la significativité de nos résultats. De plus, la grille d'évaluation de la douleur nous permet d'établir des points limites qui entraîneront l'euthanasie de la souris dès l'apparition de critères définis (Raffiner) (prostration, faiblesse pour se déplacer ou masse tumorale >1500mm<sup>3</sup> par exemple).

Ce projet comporte 5 procédures modérées pour un total de maximum 3200 souris femelles (lors des études cancer induits par le papillomavirus, cancer de la vessie ou cancer du côlon) ou des souris males (cancer de la prostate).

**9179** Au sein du laboratoire, un protocole de différenciation a permis d'isoler une population de kératinocytes humains obtenus à partir de cellules souches embryonnaires humaines, capable de reconstituer un épiderme fonctionnel. Ce protocole permet d'envisager la fabrication d'un produit d'ingénierie tissulaire pour un essai clinique de greffe cutanée dans l'indication du traitement de l'ulcère de jambe chez les patients atteints de drépanocytose. Dans un premier temps, nous avons mené à bien une série de greffe d'épiderme reconstruit, nous permettant d'envisager la finalisation de ce projet. En effet, nous avons démontré que les kératinocytes produits à partir des cellules souches embryonnaires étaient capables de former un épiderme fonctionnel sur la souris, après une greffe et un suivi à 15 jours, 3 et 6 mois sans apparition de tumeurs (tératomes), ni dissémination des cellules greffées dans les différents organes de l'animal.

Dans cette nouvelle demande, les kératinocytes seront produits à partir d'une lignée de cellules souches embryonnaires humaines de grade clinique permettant de fixer un procédé de production du produit thérapeutique et de valider le lot de kératinocytes qui sera utilisé dans l'essai clinique. Ces lots cellulaires, combinés à la matrice seront appelés PACE1 et PACE1' dans ce document.

Les études pré-cliniques décrites ici comprendront trois phases : (i) étude d'efficacité du produit thérapeutique, (ii) greffe d'épiderme reconstruit, suivi de la formation de tératome et biodistribution à long terme à partir de cette greffe, et finalement, (iii) étude d'un produit thérapeutique « amélioré » contenant d'autres types cellulaires cutanés comme des mélanocytes, des fibroblastes du derme ou des cellules vasculaires appelé PACE2 dans la suite du document.

Afin de Réduire le nombre d'animaux et d'avoir une cohérence expérimentale dans cette partie préclinique, nous avons décidé d'utiliser la même lignée de souris dans toutes les expériences. Nous choisissons d'utiliser la souris Nude (Swiss Nude, Crl : NU(Ico)-Foxn1nu) capable de supporter une xéno greffe, pour effectuer cette étude préclinique. De plus, avant le passage à cette étape chez l'animal, toutes les études préliminaires en culture (in vitro) ont été et seront réalisées. Par ailleurs les témoins expérimentaux serviront à la fois aux tests avec les greffes d'épiderme du produit préparé pour les essais cliniques mais également pour les futurs produits « améliorés » contenant d'autres types cellulaires.

Dans le but du Remplacement, des données préliminaires in vitro ont été obtenues mais l'étude de la prise de greffe in vivo est une étape indispensable avant le passage sur l'homme. Elle permettra d'apprécier la prise de greffe dans un environnement physiologique (remodelage matriciel, formation des nouveaux vaisseaux, fonctionnalité de l'épiderme formé dans son rôle protecteur). De plus, dans le cadre d'obtenir des données supplétives indispensables au passage d'une étude préclinique de toxicologie réglementaire qui sera menée par un prestataire BPL, nous ne pouvons remplacer ces expérimentations animales.

Enfin, concernant le Raffinement, l'hébergement des animaux post opératoire a été pensé afin d'éviter toute agression pouvant provoquer des blessures sur la greffe (isolement des souris en environnement enrichi). Lors de la greffe, les animaux sont anesthésiés et un analgésique (paracétamol) est introduit dans l'eau de boisson pendant une semaine postopératoire. De la gelée nutritive et hydratante sera également disposée dans les cages pendant une semaine en complément de la nourriture sèche habituelle. Après une surveillance post-opératoire et un suivi visuel du greffon, un regroupement des animaux sera réalisé lorsque la greffe sera établie (cicatrisation complète et perte du pansement biologique) et qu'il n'y aura plus de risque de blessure inter-individu.

Au total, 112 animaux serviront à finaliser cette étude permettant d'envisager une étude réglementaire pour le passage au premier essai clinique chez l'homme.

**9180** La peste équine est une maladie des équidés endémique en Afrique due à un orbivirus (AHSV) et transmise par des insectes piqueurs du genre Culicoides. AHSV a été à l'origine de foyers dans la péninsule ibérique à la fin des années 1980. La mortalité des chevaux peut atteindre 90% dans les foyers épidémiques. Il existe un vaccin vivant atténué par passages successifs sur des cultures cellulaires qui confère une protection partielle mais qui, parce que vivant, est strictement interdit dans les pays indemnes comme ceux de l'UE.

Nous développons actuellement des vaccins vivants contre les maladies virales animales basés sur l'inoculation de virus qualifiés de DISC (disabled infectious single cycle) produits en laboratoire. Les virus DISC infectent les cellules d'une façon similaire aux virus "sauvages" (c'est à dire les virus non

modifiés par l'Homme) et leur font produire une grande quantité de protéines virales qui déclenchent la réponse immunitaire de l'hôte mais ils sont incapables de se répliquer dans les organismes auxquels ils ont été administrés et demeurent confinés aux quelques cellules initialement infectées. L'utilisation de virus DISC, construits à partir du génome du virus sauvage tout en le rendant incapable de se multiplier, présente un certain nombre d'avantages sur les méthodes vaccinales traditionnelles. Notamment, à partir du moment où un virus a été identifié et que son génome est décodé, le délai global de production des premiers virus DISC au laboratoire est extrêmement court (de quelques semaines à quelques mois) et permet de réagir efficacement aux épisodes d'émergence virale. Dans un travail précédent, nous avons pu vérifier le caractère protecteur de notre type de vaccin vis à vis de l'inoculation de différentes souches d'AHSV chez des poneys. L'objectif du présent projet est de qualifier chez le poney la durée de la présence d'anticorps circulants après une vaccination avec un des vaccins DISC produits.

Pour ceci nous envisageons d'utiliser 6 poneys. Tous seront vaccinés au début du projet et subiront une prise de sang hebdomadaire destiné à quantifier les anticorps circulants. Nous n'attendons pas de signes cliniques chez les animaux (à part une légère fièvre au moment de la vaccination, le cas échéant).

Pour ce genre d'études, le recours à l'animal de l'espèce cible du virus est une étape indispensable de validation. Les animaux sont hébergés dans des conditions similaires à celles des animaux des mêmes espèces en dehors des périodes de leur utilisation de loisir. Des friandises leur seront distribuées afin de les habituer à la manipulation par l'Homme. Nous utilisons un nombre aussi réduit que possible d'animaux et nous estimons pouvoir nous passer d'animaux témoins.

**9181** La recto-colite hémorragique (RCH) est une maladie chronique inflammatoire en constante augmentation dans les pays développés et en forte incidence dans les pays émergents. Les lésions inflammatoires sont localisées au niveau du rectum et du côlon. Il n'existe pas de traitements curatifs mais seulement suspensifs. La maladie fonctionne souvent par la succession de poussées inflammatoires et de périodes de rémission plus ou moins longues. Seuls, le tabac et l'appendicectomie à un jeune âge préviennent l'apparition de la colite ou les rechutes. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes de l'appendicectomie (avec ou sans appendicite) qui conduisent à la protection de la recto-colite.

Un modèle original de colite spontanée chez la souris a été récemment développé dans le laboratoire qui reproduit l'ensemble des caractéristiques cliniques et histologiques de la RCH humaine. Ce modèle est issu du croisement de souris déficientes pour la NADPH oxydase 1 (NOX1 : enzyme produisant des formes réactives de l'oxygène principalement exprimée dans l'épithélium colique) et des souris déficientes en IL-10 (cytokine anti-inflammatoire impliquée comme gène de susceptibilité de la RCH). Les souris NOX1/ IL10 double Knock-out (NOX1/ IL10 dbKO) développent une colite dès 8 semaines d'âge chez les mâles et plus tardivement chez les femelles.

Il existe un modèle d'appendicite murin par création d'un néo-appendice à partir du patch caecal murin (équivalent lymphoïde de l'appendice humain) et par obstruction de cet appendice. L'équivalent d'une appendicite est obtenu en 7 jours.

Il a été décrit dans la littérature que l'appendicectomie réalisée en préventif protège contre la colite dans plusieurs modèles expérimentaux (colite chimiquement induite ou colite induite par transfert de cellules immunes naïves dans des souris immunodéprimées). Cependant, dans ces modèles, l'appendicite précédant l'appendicectomie ainsi que les mécanismes protecteurs impliqués n'ont pas été caractérisés.

Dans la première partie de ce projet, nous allons analyser la composition du patch caecal en cellules immunitaires chez des souris sauvages (WT) ou les souris NOX1/ IL10 dbKO après induction d'une appendicite en les comparant à des souris contrôles. Cette partie permet d'identifier des cellules immunitaires qui pourraient jouer un rôle protecteur dans la rectocolite hémorragique.

Dans un deuxième temps, des sous-populations immunitaires issues de l'appendicite seront triées et injectées dans deux modèles de colite différents afin d'étudier leur effet protecteur sur la RCH.

Ce projet répond à la règle des 3R à savoir remplacer, réduire et raffiner.

Aucune lignée cellulaire ne pourrait, actuellement être substituée aux modèles animaux dans le cadre de ces études physiopathologiques. Pour ce projet, nous avons estimé que le nombre d'échantillons

par groupe ne devait pas excéder n=10, soit un nombre global d'animaux de 170. Ce nombre permet d'optimiser les données issues de chaque souris tout en limitant leur nombre. Les animaux seront anesthésiés et opérés dans des conditions d'isolement afin d'éviter tout stress inutile. La deuxième partie du projet ne débutera qu'une fois la première partie finalisée et analysée. Pour la première étude, les souris subissant une chirurgie d'induction de l'appendicite recevront 10 mg/kg de xylazine avant chirurgie afin de limiter la douleur. Les souris anesthésiées seront maintenues sur une plaque chauffante tout au long de la chirurgie et sous une lampe chauffante jusqu'au réveil pour éviter toute hypothermie. Les souris seront surveillées quotidiennement en post-opératoire pendant une semaine et en cas de signes cliniques de douleur une dose identique de xylazine (10mg/kg) leur sera administrée. Tout au long des procédures expérimentales, les souris seront surveillées quotidiennement afin de détecter les signes cliniques péjoratifs. Le cas échéant, l'euthanasie des animaux sera appliquée.

**9182** En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives au gavage chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25).

Depuis 2009 des essais ont été réalisés chez l'oie. Ces travaux ont consisté à exploiter le comportement d'hyperphagie, ou de « boulimie », observé à l'état naturel chez les oiseaux durant la période pré-migratoire pour constituer les réserves énergétiques nécessaires aux longs vols et ont permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté pendant 12 semaines, durant la période hivernale et après une phase de restriction alimentaire, associée à une réduction de la durée du jour en bâtiment obscur (de 10 à 7 h/j) durant la période automnale, permettait l'expression d'un comportement « boulimique » transitoire chez l'oie, associé à un engraissement spontané très variable du foie. La réduction de la durée du jour a été appliquée dans les différents protocoles que nous avons conduits jusqu'à ce jour, mais son efficacité n'a jamais pu être clairement démontrée. C'est l'un des objectifs de cette étude. D'autre part, la possibilité de générer ce comportement « boulimique » en période printanière (correspondant à la phase « retour » de la migration) n'a jamais été évaluée. Dans ce cas, c'est le rallongement de la durée du jour qui serait un facteur déclenchant. Cette étude vise également à répondre à cette question.

Ce projet repose donc sur une stimulation de la consommation des oies en phase hivernale et au printemps (2 essais identiques à deux périodes différentes impliquant chacun 300 oies du même type génétique, appelé ici « Type génétique A »), en s'appuyant sur la même procédure que celle évoquée dans le paragraphe précédent, avec les caractéristiques suivantes : 1) des cycles lumineux contrôlés simulant la période pré-migratoire automnale (raccourcissement de la durée du jour de 10 à 7h) ou printanière (rallongement de la durée du jour de 10 à 14 h), 2) à chacune des deux périodes, un groupe 'témoin' sera maintenu à 10 h d'éclairement, 3) afin de vérifier si l'effet de la stimulation lumineuse répond bien à un mécanisme physiologique en lien avec les cycles annuels de sensibilité à la lumière, le raccourcissement et le rallongement de la durée du jour seront testés tous les deux à chacune des deux périodes (cela correspond donc à trois modalités par période : maintien de la durée du jour à 10 h, raccourcissement à 7 h, rallongement à 14h), 4) tous les animaux, quel que soit le traitement lumineux, ont accès à du maïs grain à volonté à partir de 19 semaines d'âge, après une période de restriction alimentaire de 13 à 19 s d'âge, et ceci jusqu'à 31 semaines d'âge.

L'essai sera effectué sur des oies mâles avec un effectif de 300 oisons mis en place pour chacune des deux périodes. A 15 et 19 s d'âge, respectivement 18 (6/modalité de traitement lumineux) et 36 (12/modalité de traitement lumineux) animaux expérimentaux seront abattus afin d'évaluer les effets de la stimulation lumineuse sur la croissance et la composition de la carcasse. Durant la période de consommation de maïs (25 s d'âge, correspondant à la moitié de la période de 12 semaines pendant laquelle les animaux ont accès au maïs) et à l'issue de cette période (31 s d'âge), respectivement 30 et 52 animaux par modalité de traitement lumineux seront abattus pour évaluer l'engraissement et la composition chimique du foie, ainsi que la composition de la carcasse.

Dans le cas de l'essai hivernal, nous conduirons également l'étude sur un autre groupe de 300 oies issues d'un autre type génétique (appelé ici « Type génétique B », provenant d'un autre sélectionneur). Cela permettra de comparer les deux types génétiques majeurs en France pour leur réponse à la stimulation. Cette comparaison n'est possible que pour la phase de stimulation hivernale

car le sélectionneur qui produit les oies du « Type génétique B » ne dé-saisonne pas les reproducteurs et n'est donc pas en mesure de fournir des oisons pour l'essai de printemps.

En conséquence donc, le projet dans son ensemble comprend 300 oies du type génétique A et 300 oies du type génétique B pour l'essai d'hiver, ainsi que 300 oies du type génétique A pour l'essai de printemps.

Les 300 oies utilisées par type génétique dans chacun des essais représentent un nombre optimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées (100 oies / modalité de traitement lumineux (abattages de 6, 12, 30 puis 52 par modalité à chacun des 4 âges). L'engraissement hépatique étant très variable (coefficient de variation de 45 à 71% dans les essais antérieurs), des effectifs de 30 à 52 animaux expérimentaux par modalité de traitement lumineux et par date d'abattage au cours de la période de consommation de maïs sont nécessaires, selon l'âge, afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Les oies expérimentales seront élevées en logement fermé à partir de 15 semaines d'âge jusqu'à leur abattage pour contrôler la durée d'éclairage.

Réduction : Comme expliqué dans le paragraphe précédent, les effectifs d'animaux utilisés sont calculés pour permettre de répondre à la question posée en tenant compte de la variabilité importante de l'engraissement du foie que nous connaissons a priori. Ces effectifs sont maintenus au minimum de ce qui est nécessaire.

Raffinement : Les animaux ne seront soumis à aucune procédure provoquant de la douleur. Lorsque nécessaire, par exemple à l'occasion des pesées, les animaux seront manipulés par du personnel formé et compétent. Par ailleurs, leur santé et leur comportement alimentaire seront surveillés quotidiennement.

Remplacement : le remplacement n'est pas possible car il s'agit d'un projet de recherche à caractère agronomique réalisé sur l'espèce cible oie.

**9183** Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien, le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites de ce traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable au regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité liée aux traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres centraux chroniques tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels pathologies à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet que nous souhaitons développer vise à étudier les changements qui se mettent en place à la suite d'un traumatisme crânien, en se focalisant sur la microglie (cellules cérébrales résidentes de l'immunité innée), qui est impliquée dans le processus de neuroinflammation au cours du temps (plusieurs mois/années) après un traumatisme crânien.

Les cellules microgliales sont les cellules sentinelles du cerveau. Elles maintiennent l'homéostasie cérébrale au travers d'une constante motilité de leurs processus et la capacité à phagocyter des débris cellulaires ou tout élément susceptible de perturber l'équilibre cérébral. Nos résultats antérieurs ont montré que la nutrition lipidique, et plus spécifiquement une carence nutritionnelle en omega-3, provoque une dystrophie microgliale. Nous émettons l'hypothèse qu'une combinaison de lésion cérébrale et de carence alimentaire en omega-3 peut avoir des conséquences additives dans les cas aigus et à long terme.

Le projet s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires des conséquences chroniques d'un traumatisme crânien et d'une carence nutritionnelle dans le but de développer des approches thérapeutiques efficaces.

Pour parachever cet objectif, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin de traumatisme crânien peu invasif, nous permettant d'étudier sur le long court, à l'aide de tests comportementaux, FACS et immunohistochimie les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. De plus, le modèle murin nous permet de modifier les régimes alimentaires pour modifier la réponse inflammatoire après un traumatisme crânien, et ainsi envisager le développement de nouveaux traitements.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et qui soient susceptibles d'apporter le même niveau d'information. En effet, les cellules microgliales, une fois mises en culture, changent de phénotype pour exprimer les gènes de macrophages et non plus les gènes spécifiques de la microglie. Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car l'établissement d'un modèle de traumatisme crânien ne peut pas être reproduit *in vitro* sur des lignées de cellules, rendant impossible le remplacement de celle-ci.

Le nombre d'animaux sera réduit au maximum grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la significativité de différence entre plusieurs groupes. De plus, les analyses comportementales et histologiques seront réalisées sur les mêmes animaux afin de réduire au mieux ce nombre d'animaux. Le projet sera réalisé sur 596 C57BL/6J (298 male, 298 femelle) souris sur une durée de 4 ans.

Enfin, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié et respectant la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux. Ceux-ci ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. Toutes les précautions possibles (anesthésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux.

**9184** Un traitement agressif et précoce de la fièvre dans le cas d'une septicémie, entraîne un taux de mortalité 7 fois supérieur à celui de patients n'étant traités que tardivement avec une fièvre dépassant les 40°C. Cependant jusqu'à présent rien ne permet de distinguer les effets de la fièvre des effets des agents antipyrétiques administrés aux patients.

Ce projet consiste à étudier les effets de l'hyperthermie sur les processus inflammatoires chez la souris ainsi que le rôle des protéines de choc thermique dans ces effets.

Ces travaux permettront de mettre en évidence l'incidence de la fièvre (et des protéines de choc thermique) sur les phénomènes d'inflammations *in vivo*.

Nos objectifs sont les suivants :

- Etudier la faisabilité de la technique de mise en hyperthermie des souris (utilisation d'un tapis chauffant) dans un modèle murin ; cette étape a pour objectif de déterminer les meilleures conditions et ainsi, réduire le nombre d'animaux utilisés.

- Etudier les effets de l'hyperthermie sur l'inflammation induite chez la souris par injection intrapéritonéale d'agents inflammatoires (Monosodium Urate (MSU), Alun);

Ces expériences seront réalisées en parallèle sur des souris déficientes pour HSP70.

Les animaux seront répartis selon le plan suivant :

- Mise en place de l'hyperthermie : 9 souris C57BL6;

- Evaluation de l'effet de l'hyperthermie sur l'inflammation péritonéale chez la souris C57BL6 : 8 souris par groupe soit 32 souris ;

- Evaluation de l'effet de l'hyperthermie sur l'inflammation péritonéale chez la souris C57BL6 HSP70-/- : 8 souris par groupe soit 32 souris ;

- Soit un total de 73 souris.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord une expérience de validation de la méthode d'hyperthermie sera réalisée sur quelques animaux avant de ne réaliser qu'une seule expérience pour chaque question, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Lorsque cela est possible des expériences *in vitro* seront réalisées (prélèvement de la moelle des souris et traitements *in vitro* et utilisation des cellules en culture) permettant ainsi de s'affranchir de l'utilisation non justifiée d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux est réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

**9185** Avec plus de 9 millions de décès recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer représente aujourd'hui la seconde cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de

prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste la première cause de mortalité, chez les patients atteints de cancer. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes, 1) l'invasion des cellules tumorales à travers le tissu d'origine 2) la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, 3) l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, 4) l'extravasation c'est-à-dire le passage de la voie sanguine vers le site secondaire et 5) la colonisation dans le site secondaire et particulièrement le poumon, le foie, la moelle osseuse et le cerveau. Avec les étapes 2) 3) et 4) qui se déroulent en partie ou totalement en contact avec le sang et ses constituants tels que les plaquettes sanguines.

Outre leur rôle dans l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt des saignements après blessure au niveau des vaisseaux sanguins, les plaquettes (fragments cellulaires) ont été décrites comme impliquées dans la dissémination métastatique. En effet, plusieurs études ont suggérées que ces dernières protégeraient les cellules cancéreuses circulantes de leur destructions par le système immunitaire et faciliteraient l'adhérence des cellules cancéreuses à la paroi vasculaire. Cependant, l'importance relative de ces processus n'est pas connue, tout comme les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Notre étude permettrait de comprendre les interactions entre les cellules tumorales et les plaquettes. En effet, les événements qui se déroulent lors du transit dans la circulation sanguine des cellules tumorales sont peu étudiés.

Dans un premier temps et pour les différentes analyses d'interaction, les cellules tumorales issues de différents types de cancer seront mises en présence de plaquettes issus de sang de souris. En effet les fragments cellulaires que sont les plaquettes ne peuvent être obtenus que par un don de sang. Les résultats obtenus par ces tests ex-vivo, permettront de mettre au point des expériences plus complexes à l'aide de tests in vivo. Cette étude demande l'utilisation de 50 % des animaux demandés.

Dans un second temps, nous souhaitons comprendre le rôle des plaquettes et de leurs récepteurs dans les étapes précoces. Pour cela les cellules tumorales seront inoculées aux animaux et l'arrêt des cellules, leur survie et leur extravasation seront visualisés dans les poumons des animaux entre 15 min et 48 heures après inoculation. Les animaux utilisés présentent ou non à la surface des plaquettes les récepteurs d'intérêts (tel que les glycoprotéines VI et les récepteurs purinergiques P2Y1, P2Y12 et P2X1). Quatre lignées de cellules tumorales seront utilisées, dont les cellules B16-F10 en priorité. Ces dernières sont en effet bien référencées dans la littérature scientifique et permettent de s'appuyer sur des modèles connus. Les autres lignées de cellules ne seront utilisées que si les résultats obtenus avec les B16-F10 sont encourageants. Cette seconde partie in vivo utilisera l'autre moitié des animaux demandés.

Nous utiliserons au maximum 9672 animaux (souris, *Mus musculus*) pour cette étude avec des études ex vivo effectuées dans un premier temps suivies d'étude in vivo. Ces études seront réalisées de façon séquentielle, en effet les premières études ex vivo permettront de décider de l'intérêt de poursuivre les expériences in vivo, qui elles aussi seront réalisées de façon séquentielle.

Remplacer

Les études ex vivo peuvent également être réalisées avec des cellules tumorales humaines et des plaquettes d'origines humaines issues du sang de donneur volontaire ce qui limite le nombre d'animaux utilisés.

Cela dit, l'utilisation de souris génétiquement modifiées permet d'étudier le rôle des récepteurs plaquettaires. Les tests in vitro et ex vivo nécessitent donc le prélèvement sur souris, de sang afin d'obtenir des plaquettes.

Les études sur le rôle des plaquettes dans les métastases nécessitent d'utiliser des animaux car ce phénomène implique des interactions complexes entre les différents organes, la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisées in vitro.

Réduire

Le nombre d'animaux a été calculé pour permettre une analyse statistique avec le t-test de Student. Cette étude se fera de façon séquentielle, à chaque étape, les résultats seront analysés et la poursuite de l'étude sera évaluée. Les expériences ne seront pas poursuivies si les résultats ne se révèlent pas convainquant. En revanche, si un résultat positif est obtenu, on se focalisera sur la lignée d'intérêt, si bien que les autres lignées ne seront probablement pas étudiées dans ce projet. C'est-à-

dire que pour chacune des 13 lignées murines au minimum 6 animaux (3 Contrôles et 3 Expérimentales) seront utilisés.

Concernant les tests ex vivo, les plaquettes sanguines sont dépourvues de noyaux ce qui exclut la possibilité de réaliser des analyses in vitro sur des cultures cellulaires. La seule manière d'obtenir des plaquettes est de les isoler à partir d'un prélèvement de sang. Un grand nombre de tests sont réalisés à partir de dons volontaires de sang humain, mais pour étudier in vitro l'impact d'un récepteur muté, nous avons besoin de prélever du sang de la souris mutée.

Raffiner

Le modèle animal est choisi pour fidèlement reproduire la pathologie et en tirer le maximum d'informations. Des modèles aigus sur quelques semaines sont utilisés plutôt que des modèles génétiques qui durent plusieurs mois. Les animaux sont observés quotidiennement et le score du point limite évalué pendant la durée de l'expérience. Avant et pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. Les gestes sont réalisés par une personne compétente et maîtrisés afin de limiter toutes douleurs. Les traitements adéquats avant et après chaque procédure sont réalisés. Les doses d'anesthésiants et d'antalgiques utilisées pour certaines procédures sont maîtrisées pour empêcher le réveil de l'animal et surtout inhiber totalement la douleur.

**9186** L'hémiplégie laryngée ou cornage est une pathologie due à une lésion du nerf laryngé récurrent, gauche le plus souvent, se traduisant, via une amyotrophie d'origine neurogène, par une paralysie progressive et évolutive du cartilage aryénoïde concerné. Ceci a pour conséquence d'une part l'apparition d'un bruit à l'effort par vibration de la corde vocale qui est détendue du côté paralysé, et d'autre part une intolérance à l'effort, secondaire à l'aspiration du cartilage paralysé lors de l'inspiration, ce qui limite fréquemment les performances du cheval atteint.

Le traitement chirurgical de l'hémiplégie laryngée chez le cheval repose historiquement sur la combinaison de la laryngoplastie (pose d'une prothèse maintenant le cartilage paralysé ouvert) et de la ventriculocordectomie au laser (retrait de la corde vocale détendue). Par analogie avec la chirurgie humaine, d'autres techniques plus physiologiques ont été développées, comme la ré-innervation du larynx. Des travaux récents ont en particulier permis de valider une technique de ré-innervation du larynx combinée à une stimulation électrique non douloureuse et quotidienne du muscle déficient afin de limiter la dégradation du muscle déficient le temps de la réinnervation, voire de le restaurer.

L'objectif de ce projet est de stimuler directement le nerf greffé (et non le muscle). Ceci permettrait de restaurer de manière optimale et accélérée le muscle paralysé et donc la fonction laryngée, tout en évitant les complications de fibrose ou d'infection locale secondaires à la présence d'une électrode à proximité immédiate de l'implantation du nerf greffé dans le muscle. Après obtention de la réhabilitation laryngée, le neurostimulateur est retiré.

Ce projet est réalisé en partenariat avec un laboratoire de recherche sur le handicap ventilatoire en médecine humaine ; il inclut le recrutement de 16 chevaux naturellement atteints d'hémiplégie laryngée (acquisition ou chevaux de propriétaires inclus après signature du consentement éclairé adéquat) et répartis en 2 groupes.

Les chevaux du premier groupe (groupe traité) recevront une réinnervation du larynx avec implantation d'une électrode sur le nerf greffé. Cette électrode sera reliée à un neurostimulateur implanté en position sous-cutanée et un protocole de neurostimulation sera appliqué. Les chevaux du second groupe (groupe contrôle) recevront uniquement une réinnervation. Les chevaux des deux groupes subiront également une ventriculo-cordectomie dans le but d'obtenir une amélioration clinique partielle initiale. Les chevaux seront suivis en post-opératoire durant 15 jours. Ils seront hospitalisés en boxes et sortis à minima bi-quotidiennement en main avant de retourner à leurs conditions de vie initiales. L'évolution clinique des 2 groupes sera évaluée sur un an.

L'impact pour les animaux inclus dans le projet est faible car ils justifient tous d'une chirurgie sous anesthésie. L'inconfort supplémentaire (minime) des animaux du groupe 'traité' est lié à la pose d'un appareil de stimulation dont on peut raisonnablement espérer qu'il améliorera la clinique post-chirurgicale. Ce genre d'étude, précédant immédiatement une application clinique ne peut être réalisée ni dans une espèce modèle ni in vitro. Un nombre de 8 animaux par groupe est le minimum envisageable pour démontrer une amélioration clinique significative.



**9187** La compréhension des mécanismes à l'œuvre dans le développement, le fonctionnement normal et anormal des organismes passe notamment par une analyse de la fonction des gènes de l'échelle subcellulaire à l'échelle de l'organisme. Ce continuum d'analyses permet ensuite d'établir des propositions thérapeutiques réalistes quant à leur efficacité et leur innocuité.

La souris, de par la puissance des analyses génétiques qu'elle permet, reste un modèle inégalé dans cette approche. Certaines lignées sont ainsi utilisées pour révéler le rôle de gènes d'intérêt spécifiquement dans certains organes. Elles s'avèrent particulièrement utiles quand la perte de fonction d'un gène à l'échelle de l'organisme est létale, empêchant la description de son rôle plus tardivement ou dans d'autres organes.

Nous sommes ainsi amenés à utiliser une lignée exprimant un transgène, c'est-à-dire ici un gène qui n'est pas normalement exprimé chez les mammifères, qui après croisement avec nos lignées d'intérêt permet d'inactiver spécifiquement notre gène d'intérêt dans l'ensemble des cellules contractiles du cœur (cardiomyocytes), dès leur formation au cours du développement. Cette lignée qui exprime le transgène dans les cardiomyocytes est bien connue et décrite dans la littérature et se comporte habituellement comme une lignée sauvage. Or après transfert de ce transgène dans un autre fonds génétique, celui de nos autres lignées de souris, nous avons constaté que les souris porteuses du transgène développent à partir de l'âge de 6 mois une affection cardiaque dite cardiomyopathie dilatée qui conduit à une insuffisance cardiaque, des œdèmes et la mort en quelques semaines ou mois. Nous tenons compte de ce phénotype pour nos études et assurons toute la surveillance nécessaire à cette lignée pour détecter dès les premiers signes cliniques le démarrage d'une cardiomyopathie dilatée et euthanasions ces animaux avant tout retentissement sur leur bien-être. En parallèle de ces démarches en interne, nous considérons important dans le cadre de la nécessité de raffinement exigée par la Directive 2010/63/EU d'informer la communauté scientifique de ce phénotype afin que les chercheurs amenés à utiliser cette lignée sur ce fonds génétique très utilisé adaptent le suivi de ces animaux ou utilisent s'ils le peuvent une autre lignée qui ne présenterait pas ce phénotype.

Pour cela, nous projetons de réaliser sur 2 lots de 6 à 8 mâles et femelles porteurs du transgène et autant de souris contrôles (soit 70 souris au total) un suivi échocardiographique depuis le sevrage puis tous les deux mois jusqu'à l'apparition des premiers signes cliniques. Ces échocardiographies seront réalisées par un cardiologue très expérimenté, sur animaux vigiles, dans des conditions de calme et de rapidité (< 5 min) particulièrement bien supportées par les animaux. Après cet examen, à l'apparition des premiers signes cliniques, les animaux seront euthanasiés et leur cœur sera prélevé pour faire l'objet d'analyses histologiques et biochimiques. Compte tenu du caractère systématique du phénotype, ce nombre sera suffisant pour documenter précisément et de manière fiable ce phénotype.

Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Un suivi attentif sera apporté aux animaux porteurs du transgène afin de détecter toute apparition d'une insuffisance cardiaque et mettre en œuvre le cas échéant un examen échocardiographique, puis leur euthanasie.

Le résultat de notre travail sera ensuite publié dans un journal en accès libre pour une diffusion facilitée dans la communauté scientifique.

**9188** Les hormones glucocorticoïdes (GC), cortisol chez l'homme et corticostérone chez les rongeurs, ont un rôle important dans la régulation de l'humeur, de la mémoire et aussi de l'équilibre énergétique. En effet ces hormones régulent le comportement alimentaire et le métabolisme du glucose, des lipides et des protéines. L'excès de GC est rencontré chez des personnes atteintes du syndrome de Cushing dans lequel une tumeur au niveau des glandes surrénales (productrices des hormones GC) ou au niveau de l'hypophyse (glande à la base du cerveau dans laquelle est produite l'ACTH peptide qui va stimuler les surrénales pour produire des GC). Un excès de GC peut aussi être du à un traitement aux corticostéroïdes lors d'arthrite rhumatoïde ou de néphrose par exemple pour leurs effets anti-inflammatoires. Cependant l'excès de GC est très souvent associé à des troubles de l'humeur et de la mémoire, et à une obésité viscérale ainsi qu'à des complications métaboliques telles que la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie. Depuis plusieurs années nous travaillons sur la

Corticosteroid Binding Globulin (CBG) qui est la protéine de liaison des glucocorticoïdes dans le plasma. Nous avons créé une souris totalement déficiente en cette protéine, la souris CbgKO. La déficience totale de CBG obtenue chez la souris Cbgko conduit, chez les mâles et les femelles, à des réponses de stress altérées se caractérisant par des comportements de résignation augmentés (test de la nage forcée, test de résignation apprise) et des problèmes de mémoire (défaut d'acquisition et de consolidation, insensibilité à l'effet délétère du stress sur le rappel de mémoire). Ces altérations sont associées à une élévation sous-optimale des GC en situation de stress. Ces données ont été obtenues sur un fond génétique C57Bl/6J.

Les objectifs de ce projet sont 1) d'analyser si ces altérations sont aggravées lorsque la délétion de la CBG se trouve dans un fond génétique Balb/C, ces souris étant plus émotives que les C57Bl/6J et elles ont un système GC plus faible. 2) d'analyser le rôle de la CBG suite à un régime riche en gras et/ou en sucre conduisant à l'obésité chez les souris avec fond génétique C57Bl/6J qui sont prônes à l'obésité 3) d'étudier le rôle de la CBG dans un modèle d'excès de GC mimant le syndrome de Cushing.

Pour le premier objectif nous utiliserons des tests comportementaux permettant d'évaluer l'émotivité et la mémoire des souris Cbgko sur fond Balb/C avec en parallèle des mesures biochimiques pour estimer l'activité des GC. Pour le deuxième objectif, nous analyserons d'abord des souris C57Bl/6J non mutantes soumises à un régime hyperlipidique pour examiner comment et à partir de combien de temps la CBG est modifiée par ces régimes. Ensuite nous analyserons plus précisément le rôle de la CBG en soumettant les souris CbgKO à ce même régime enrichi en gras et en sucre. Enfin, pour l'objectif 3 nous analyserons comparativement l'effet d'un excès de GC donné dans l'eau de boisson sur l'émotivité, la mémoire et le métabolisme (obésité viscérale, diabète) chez des souris Cbg ko et des souris contrôles. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons qu'au maximum 12 animaux par groupe expérimental et par sexe seront nécessaires pour mener à bien notre projet. Ceci représente un total de 792 souris. Toutes les souris seront manipulées quotidiennement pendant la semaine précédant le début des mesures comportementales afin de les habituer à cette procédure et réduire ainsi le stress lié à la manipulation. De même, une attention particulière sera apportée lors des tests comportementaux pour qu'ils se déroulent dans des conditions les plus calmes possibles afin de ne pas perturber les animaux et donc risquer d'altérer leur comportement. Enfin, les souris seront anesthésiées avant euthanasie afin de ne pas le faire subir de souffrance.

- 9189** Les pesticides sont des produits dangereux, dont l'usage est strictement réglementé. Des données contradictoires ont été publiées, qui laissent craindre qu'une exposition chronique à de faibles doses de certains de leurs composés mette en danger le développement cérébral des embryons humains. Le risque que nous cherchons à évaluer, parce qu'il a pu être sous-évalué lors des tests réglementaires, est celui d'une interférence avec le fonctionnement de l'hormone thyroïdienne, l'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer cette toxicité neurologique. On sait en effet que cette hormone joue un rôle important dans le développement cérébral et qu'un déficit en hormone conduit à des déficiences intellectuelles. Les tests in vitro ne permettent pas de prédire avec certitude l'influence d'une exposition in vivo : ils ne prennent pas en compte le métabolisme hépatique, qui génère des composés dérivés parfois plus toxiques que le composé d'origine, et n'intègrent pas la biodisponibilité des molécules (catabolisme, élimination par les reins, stockage dans les adipocytes, passage à travers la barrière placentaire, passage à travers la barrière hémato-méningée, etc.). Ce projet consiste à étudier la signalisation thyroïdienne dans le cerveau de souriceaux exposés à des pesticides pendant la gestation et le développement postnatal. Les pesticides testés dans ce projet auront tous été identifiés au préalable comme perturbant la signalisation thyroïdienne de cellules en culture. Ce projet nécessitera l'utilisation de 1600 souris. Ce nombre d'animaux est un nombre maximum, qui prévoit des répétitions d'expériences en cas de problème. Il se base sur le test de 4 molécules, mais il est possible que le nombre de molécules testées réellement in vivo soit inférieur, en fonction des résultats des tests in vitro à venir.

Les doses administrées seront toutes inférieures aux doses connues pour avoir des effets toxiques. Les souris seront examinées avec soin tout au long de l'administration des pesticides. Des points limites adaptés ont été définis de façon à éviter toute souffrance inutile.

**9190** Le système vestibulaire est responsable de l'équilibre. Ce système repose sur la prise en compte, en temps réel, de nombreuses entrées sensorielles qui participent à la stabilisation du regard et de la posture pendant la locomotion : la vision, les informations de l'oreille interne et les informations proprioceptives participent toutes au sens de l'équilibre.

Suite à une lésion vestibulaire, il a été montré que les signaux proprioceptifs en provenance du cou et du tronc prenaient une part importante dans le rétablissement de l'équilibre. Une meilleure connaissance des voies anatomiques et de la physiologie des structures responsables de ces voies spino-vestibulaires est nécessaire. En effet, le traitement des troubles de l'équilibre, en particulier chez les personnes âgées, constitue un enjeu majeur de santé publique.

Le projet porte sur la question des interactions entre les systèmes spinaux et les systèmes de contrôle du regard. Son but est de montrer l'existence d'un signal nerveux, issu des réseaux de la moelle, envoyé vers les structures du tronc cérébral qui commandent la stabilisation du regard. Dans le cas de la locomotion, ce signal permettrait la prise en compte des mouvements générés par l'organisme pour favoriser des mouvements compensatoires du regard et ainsi assurer une vision stable.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nos expériences sont basées sur les résultats obtenus préalablement chez le xénope. Un total de 250 souris adultes sera nécessaire à la réalisation de cette étude. Ce modèle animal a été choisi car il permet de combiner des expériences au niveau anatomique, cellulaire, et comportemental. En l'état de nos connaissances, il n'est pas possible en effet de remplacer complètement le modèle animal. Cependant, les démonstrations établies dans ce projet ont vocation à permettre, à terme, la modélisation de ces systèmes en vue de leur exploration in silico.

La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/ analgésie).

La procédure chirurgicale, réalisée sous anesthésie générale profonde, consiste à déconnecter les réseaux spinaux -qui génèrent la locomotion- du cerveau, afin d'étudier le rôle de ces réseaux dans les activités automatiques et réflexes du contrôle de l'équilibre. Cette procédure supprime les circuits de la douleur. Les mouvements oculomoteurs réflexes seront enregistrés par vidéo-oculographie.

Ces données fondamentales auront un impact direct pour la prise en charge des pathologies en lien avec la perte d'équilibre chez l'homme.

**9191** Notre objectif est de démontrer que l'historiatrie (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'historiatrie in vitro (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises (remplacement).

L'enjeu serait de proposer une thérapeutique non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme.

L'expérimentation sur gros animal, avec thérapie non invasive, est une étape indispensable pour améliorer notre technologie et valider son innocuité in vivo. De plus, nous avons besoin de travailler in vivo sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle porcin est donc nécessaire. Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire au maximum le nombre de porcs : nous avons évalué à 65 porcs le nombre minimum de porcs requis pour ce projet répartis sur 5 ans. Ce nombre permettra de répondre aux objectifs scientifiques et techniques de ce projet sans utilisation supplémentaire d'animaux. La technique sera testée sur valve native des animaux ou sur bioprothèses calcifiées suivant les procédures.

Pour éviter toute souffrance aux animaux, ils seront sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention.

L'application de notre thérapie par ultrasons sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie

valvulaire) normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrasons), sans chirurgie ni cathétérisme. Cette nouvelle approche si elle s'avère positive transformera la prise en charge des patients avec rétrécissement aortique calcifié.

**9192** Le contrôle actuel des infections par les trypanosomatidés passe principalement par la chimiothérapie. Cette dernière est malheureusement mise en péril par un arsenal thérapeutique ancien et limité et des traitements longs, toxiques et onéreux, s'accompagnant de nombreux cas de rechute. L'émergence de chimiorésistance aux traitements rend la situation encore plus préoccupante en termes de santé publique et vétérinaire. Il est donc essentiel de sélectionner de nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces et surtout moins toxiques. Nous testons également des associations de produits connus, parfois anciens, utilisés dans d'autres pathologies, qui peuvent agir de façon synergique. Ces associations permettent de réduire les doses des médicaments efficaces donc leur toxicité, et de diminuer l'émergence de chimiorésistance.

Le vaccin représente une des meilleures solutions pour lutter contre les agents infectieux et la recherche de nouvelles cibles non seulement thérapeutiques mais aussi vaccinales est essentielle. Cette recherche est basée sur une meilleure connaissance des réponses immunitaires, certaines permettant l'élimination du parasite et d'autres, au contraire, facilitant son maintien et sa multiplication chez son hôte. Ainsi, nous avons mis en évidence une nouvelle voie induite par les parasites leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et de bénéficier de facteurs essentiels à sa croissance. Ce mécanisme serait également utilisé par les parasites de l'homme.

Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires à 2500 souris et 100 rats

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment dans un souci de respect du R de réduire, nous avons défini un nombre minimal d'animaux par groupe en cohérence avec nos analyses statistiques. Des tests préliminaires effectués *in vitro* contribuent à réduire le nombre d'animaux utilisés.

En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter qu'il n'existe pas de modèles *in vitro* représentatifs de l'évolution de ces parasites; de plus, la culture *in vitro* modifie la majorité de leurs propriétés.

Dans le respect du R de raffiner, une vigilance accrue sera accordée à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement (soins, enrichissement, nursing).

**9193** L'hypertension artérielle est une des premières causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. C'est un facteur de risque très important pour de nombreuses pathologies ayant des conséquences cardiovasculaires (hypertrophie ventriculaire gauche, insuffisance cardiaque), neurologiques (accident vasculaire cérébral) et rénales (néphroangiosclérose).

Malgré son importance, les mécanismes moléculaires expliquant l'hypertension sont peu connus chez une majorité de patients.

Il est maintenant clairement établi par de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal qu'un apport excessif en chlorure de sodium est un facteur de risque important pour le développement d'une hypertension. Récemment, plusieurs auteurs ont proposé que la peau est également un réservoir de chlore et de sodium pour l'organisme et que sa perturbation est associée à des modifications de pression artérielle. Il a été montré que la réactivité neurovasculaire cutanée est abolie par la charge en chlorure de sodium après deux semaines de traitement chez la souris.

Notre projet aura pour but d'étudier le rôle respectif du chlore et du sodium dans les effets néfastes du chlorure de sodium sur la réactivité neurovasculaire cutanée. Nous étudierons également la capacité de cicatrisation de ces souris si des altérations de la réactivité neurovasculaire sont observées

Nous étudierons également si ces effets sont réversibles.

L'exploration fonctionnelle de la réactivité neurovasculaire nécessite une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Bien que cette procédure n'induisse pas de douleur chez l'animal, une anesthésie légère est pratiquée permettant une immobilisation de l'animal afin de réduire son stress. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans

compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué au minimum 3 fois par semaine. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal.

Ce projet concernera 540 souris au maximum.

**9194** Dans la majorité des troupeaux ovins, on trouve des agneaux orphelins ou délaissés par leur mère ainsi que des brebis prolifiques dont la lactation est insuffisante. Comme il est difficile de faire allaiter un agneau par une brebis qui n'est pas sa mère, l'allaitement artificiel est la solution de rigueur, les éleveurs remplaçant le lait de la mère par un aliment commercial distribué aux agneaux au moyen d'un nourrisseur. Le principal avantage de l'allaitement artificiel est la possibilité de sauver des agneaux qui autrement sont voués à la mort. Cependant l'allaitement artificiel n'offre pas des gages de satisfaction en particulier les agneaux sont chétifs, présentent des diarrhées fréquentes et une mortalité plus élevée que chez les agneaux laissés avec leur mère. Récemment, un problème de surmortalité important (40-80 %) et parfois tardif (à 3 semaines d'âge) a été soulevé sans que les raisons en soient connues.

Nous proposons dans ce projet d'apporter au lait commercial des prébiotiques oligosaccharides qui favorisent l'implantation de communautés bactériennes primocolonisatrices pour prévenir les effets délétères de l'allaitement artificiel. Nous suivrons la santé des animaux et leur développement cérébral jusqu'à l'âge de 10 semaines. Celui-ci sera suivi par une méthode non invasive l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

Cette étude respecte la règle des 3R :

Remplacement : Cette étude s'intéressant à l'adaptation de l'animal à l'allaitement artificiel, il ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Réduction : Vingt-quatre agneaux sont requis ce qui constitue un nombre minimum compte-tenu des aléas expérimentaux.

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour favoriser le bien-être des animaux notamment en préservant leur besoin d'être en contact avec leurs congénères (enrichissement social) et en leur apportant nourriture et soins ajustés à leur condition physiologique. De plus, les agneaux seront habitués à la manipulation humaine par un contact doux quotidien pendant une semaine.

**9195** Le but du projet est le développement d'un modèle de souris de néphropathie à immunoglobuline A (IgA), qui est une pathologie humaine responsable d'une évolution vers l'insuffisance rénale terminale chez 30% des patients qui en sont atteints, alors que la prévalence de la maladie est relativement fréquente, autour de 0,5% de la population.

La recherche fondamentale sur le mécanisme de la maladie est freinée par l'absence de modèle animal très représentatif de cette maladie, à savoir (1) les souris n'expriment pas immunoglobulines A1 (chaîne lourde alpha1) alors que la maladie humaine est liée au dépôt rénal glomérulaire d'immunoglobuline A1 et (2) alors que la description chez l'homme du rôle pathogénique d'un anticorps anti-immunoglobuline A1 (anti-région charnière plus précisément) est étayée par plusieurs travaux, aucun modèle murin ne reproduit cet aspect d'auto-immunité. Enfin, (3) ces souris seront croisées avec des souris PIGR (récepteur immunoglobuline polymérique épithélial) knock out permettant de dérouter les immunoglobulines A d'une destinée muqueuse vers une destinée systémique, ce qui est une caractéristique de la maladie humaine.

Ce projet visera donc, en réponse à ces 2 aspects, à l'usage de souris transgéniques humanisées, exprimant le gène alpha1 en lieu et place du gène mu, en vue d'une immunisation par approche vaccinale à partir d'un peptide synthétique reproduisant la région charnière des IgA1 afin de reproduire le mécanisme d'auto-immunité de la néphropathie à IgA, permettant in fine d'établir 1) les facteurs nécessaires à l'initiation et à l'aggravation *in vivo* de la maladie 2) de permettre le développement de thérapies ciblées et 3) de transférer ces connaissances en pathologie humaine afin de générer des biomarqueurs de la maladie et surtout des traitements. Seule l'approche

in vivo sur l'animal permet d'obtenir ces avancées. Les souris PIGR knock out croisées avec les souris exprimant le gène alpha1 humain permettra de favoriser le développement de la maladie.

Les souris alpha1 KI et les souris PIGR KO sont d'ores et déjà disponibles avec un accord de transfert par le laboratoire source.

Ces souris seront immunisées par voie systémique (dans la queue de l'animal) ou par voie muqueuse digestive (dans l'eau de boisson) afin de produire une réponse immunitaire anti-IgA1, permettant de produire des complexes immuns responsables de la maladie. Environ 200 individus seront nécessaires.

L'évaluation de la survenue de la maladie reposera sur l'analyse de la réponse anticorps plasmatique et muqueuse anti-région charnière (prélèvements de sang, selles), de l'apparition de signes de la maladie (protéinurie, hématurie, élévation de la créatinine plasmatique) et après euthanasie, l'apparition de dépôts glomérulaires d'immunoglobuline A ainsi que des signes d'inflammation rénale. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). La maladie n'entraîne aucun inconfort sauf si une insuffisance rénale terminale ou une protéinurie massive apparaissent, complications définies comme points limite au cours de l'étude. Aucune douleur n'est attendue suite à la vaccination par voie muqueuse (eau de boisson), alors que la vaccination par voie systémique occasionne une sensation de piqûre, dont la douleur est limitée. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

**9196** Ce projet pédagogique permettra aux étudiants de pharmacie d'étudier les effets pharmacologiques de substances actives sur le cœur isolé de rat. Après anesthésie de l'animal, le cœur battant sera prélevé par l'enseignant, puis monté dans une cuve adaptée à enregistrement de paramètres cardiaques et permettre d'étudier les effets directs de substances pharmacologiques. Ce nouvel enseignement a pour objectif de remplacer les travaux pratiques réalisés sur des animaux anesthésiés par l'étude des effets pharmacologiques sur un organe isolé.

Les avantages de la mise en place de cette nouvelle approche expérimentale par rapport à celle actuellement employée sont les suivants :

1) Réduction considérable du nombre d'animaux à euthanasier pour une durée de 5 ans : 95 rats pour le cœur perfusé contre 280 rats pour l'approche in vivo, car grâce cette nouvelle approche expérimentale, un grand nombre d'animaux pourront être mutualisés avec d'autres travaux pratiques effectués en même temps dans le laboratoire.

2) L'expérimentation sur l'animal anesthésié actuellement en place (pose de cathéters, canules, accidents opératoires, hémorragies, décès précoces) peut être psychologiquement traumatisante pour certains étudiants même si ce travail expérimental est réalisé seulement par des étudiants volontaires. Les étudiants réfractaires à l'expérimentation animale ont la possibilité de travailler sur un autre modèle expérimental ex vivo permettant d'étudier les effets pharmacologiques d'un autre principe actif synthétisé par eux même.

3) Les résultats in vitro sont plus reproductibles et plus facilement interprétables par les étudiants car il s'agit d'un système moins intégré que l'animal entier et donc moins complexe dans l'interprétation des résultats.

4) La mesure de nouveaux paramètres cardiaques sur cœur isolé (contraction myocardique) et la détermination de la fréquence cardiaque sera plus précise par cette approche expérimentale que celle mesurée sur l'animal anesthésié.

5) Des compétences pratiques moins élaborées en expérimentation et chirurgie animale pour le personnel enseignant peuvent suffire pour encadrer ce nouveau système in vitro.

Ces arguments nous encouragent fortement à remplacer l'enseignement pratique actuel par cette nouvelle approche expérimentale qui répond aux exigences de la règle des 3R. Réduction du nombre d'animaux expérimentés par rapport au nombre actuel. Raffinement par la manipulation rapide des

animaux par rapport aux travaux pratiques in vivo, permettant une anesthésie sans risque de réveil. Remplacement du modèle animal difficile à mettre en œuvre car il est important pour les étudiants de pouvoir visualiser les effets pharmacologiques de substances actives synthétisées par eux-mêmes (chaîne du médicament), ce qui n'est pas encore possible de réaliser dans le laboratoire sur d'autres types de modèles in vitro ou in silico.

**9197** L'obésité maternelle, chez l'homme comme dans des modèles animaux, est associée à un risque plus élevé d'apparition de troubles du développement cérébral (autisme, hyperactivité ...) chez la descendance. Les liens entre obésité pendant la grossesse et troubles neurodéveloppementaux ne sont pas encore établis. Notre hypothèse est que l'inflammation périphérique causée par l'obésité puisse modifier l'activation des cellules immunitaires du cerveau en développement du fœtus, et participer à la mise en place de ces troubles. Nous pensons également que cette action sur les cellules microgliales de la descendance pourrait entraîner une modification de la réactivité de ces cellules en présence d'un stimulus inflammatoire et participer également à l'apparition de troubles neurodéveloppementaux.

Dans ce projet, nous allons donc nous intéresser aux conséquences de l'obésité maternelle sur la descendance et plus particulièrement sur la survenue de troubles neurodéveloppementaux chez les petits et sur l'activité des cellules immunitaires cérébrales (les cellules microgliales).

Dans cette étude, des souris femelles recevront un régime riche en graisse et en sucre (Western Diet, WD), le plus à même de reproduire l'obésité telle qu'elle est observée dans les pays développés ces 30 dernières années. Après 5 semaines de WD, ces souris seront accouplées avec des mâles ayant reçu une alimentation classique et garderont ce régime pendant toute la gestation. Elles retrouveront un régime normal (Normal Diet, ND) pendant la lactation. Tous les petits recevront une ND après sevrage. Toutes les études porteront sur la descendance des femelles obèses, à différents temps. Parallèlement, des souris contrôles gestantes recevront une ND tout au long de l'étude. De plus, la moitié de chaque portée (WD et ND) recevra une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS), un composé classiquement utilisé pour mimer les infections bactériennes périphériques. Ces groupes permettront de voir si l'obésité maternelle augmente la sensibilité de la descendance aux infections périnatales.

Réduction : dans les études portant sur le développement et les troubles associés au développement, l'unité statistique de référence est toujours la portée. De plus une différence entre les petits mâles et femelles est attendue. Afin de pouvoir obtenir assez de portée, et assez de mâles et femelles, pour avoir des résultats statistiques avec les méthodes utilisées, notamment le comportement pour lequel un minimum de 10 animaux par groupe est nécessaire, nous utiliserons 10 femelles gestantes par groupe (4 groupes : ND-véhicule, ND-LPS, WD-véhicule et WD-LPS). Afin d'être sûrs d'obtenir 10 femelles gestantes par groupes, nous utiliserons 12 femelles et 7 mâles (1 mâle pour 2 femelles + 1 mâle surnuméraire) pour chaque groupe, soit  $(12+7)*4 = 76$  animaux pour l'obtention des petits. Considérant 6 petits par portée, nous estimons à 288 le nombre de petits obtenus dans cette étude soit un total de 364 animaux. Ce nombre pourra être moindre en fonction du nombre de petits par portée et du nombre de femelles gestantes.

Il n'est pas possible de diminuer le nombre de femelles gestantes afin d'obtenir des résultats pouvant être exploités correctement.

Raffinement : les animaux seront hébergés en groupes socialement harmonieux dans des cages adaptées à leur nombre et à leur poids. Les animaux recevant une WD auront une semaine de transition avec un régime moyennement riche en graisse avant de recevoir la WD afin de limiter l'apparition de troubles digestifs. Après la mise au mâle les femelles gestantes seront isolées car ce sont les conditions idéales pour la gestation. Après sevrage, les mâles et les femelles des différentes portées seront hébergés en groupes socialement harmonieux de mâles et de femelles.

Les animaux en groupe seront hébergés en présence de deux éléments d'enrichissement : une petite maison en carton (mouse smart home) et un Nestlets. Les femelles gestantes et leur portée seront hébergées avec du Sizzle Nest.

Remplacement : cette étude porte sur l'inflammation systémique et le développement cérébral, il n'est donc pas possible d'utiliser de méthode de remplacement.

**9198** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire); lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles uniquement lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La chèvre est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une quantité importante d'anticorps est requise. Elle permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 chèvres.

Le temps minimum d'immunisation est de 77 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les chèvres sont hébergées en groupe dans des enclos structurés afin de pallier toute forme de détresse. Des objets d'enrichissement sont placés dans les box afin de stimuler l'activité des animaux.



**9199** Le contexte scientifique du projet est de comprendre comment des cellules souches localisées dans le cerveau des mammifères et identiques morphologiquement sont capables de donner naissance à plusieurs types de neurones, qui ont des formes, des fonctions différentes et qui peuvent migrer vers des zones géographiques différentes dans le cerveau. Ce processus qui part de la cellule souche pour arriver à un neurone mature et fonctionnel est appelé neurogenèse. La neurogenèse du bulbe olfactif (région du cerveau qui reçoit l'information sensorielle olfactive en provenance de la muqueuse de la cavité nasale) représente un modèle principal pour étudier les différents aspects de la génération des neurones tels que la biologie des cellules souches, la détermination neuronale, la migration et la différenciation cellulaire. De plus ces cellules souches sont capables de se détourner de leur fonction première en condition pathologique pour participer à la réparation du cerveau en cas de lésion.

Le bulbe olfactif est un des 2 seuls territoires du cerveau où de nouveaux neurones sont produits continuellement au cours de la vie chez les mammifères et présente un potentiel intéressant pour des approches de thérapie cellulaire dans des modèles de maladies neurodégénératives. L'objectif de ce projet est d'identifier les gènes et les mécanismes qui contrôlent les différentes étapes de la neurogenèse et de tester leur fonction in vivo dans le cerveau de souris, c'est à dire en condition physiologique. La neurogenèse est un processus qui dépend de l'environnement cellulaire dans le tissu nerveux et de l'environnement olfactif dans lequel évolue l'animal. L'ensemble de ces critères fait qu'il est indispensable d'étudier ce processus in vivo et nous avons choisi la souris comme modèle d'étude. Nous utiliserons principalement une approche expérimentale simple et rapide qui permet de modifier l'information génétique des cellules souches directement dans le cerveau de souris nouveau-nés. Grâce à cette méthode, nous pouvons étudier la fonction de plusieurs gènes différents sans créer d'animaux transgéniques par les méthodes classiques et par conséquent en limitant le nombre d'animaux nécessaires à cette étude. Le modèle souris permet aussi d'avoir accès à des lignées de souris transgéniques mutantes déjà existantes. Nous utiliserons des lignées mutantes mais dont le phénotype est non dommageable car l'inactivation des gènes ciblés est induite seulement après la naissance et dans un nombre restreint de cellules.

Grâce à l'expérience acquise et à l'analyse statistique de résultats obtenus en utilisant ces méthodes expérimentales dans d'autres projets qui ont déjà obtenu une autorisation, le nombre d'animaux nouveau-nés (1198 : 360 non altérés + 838 transgéniques), juvéniles (18 transgéniques) et adultes (10 transgéniques) qui seront expérimentés a pu être réduit au strict nécessaire.

Les souris sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis par la présence d'objets, au sein d'une animalerie exempte de pathogènes et dont les paramètres physiques et sanitaires sont strictement contrôlés. 6 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages. Après l'expérimentation, les souris sont hébergées au calme dans une salle post-opératoire dédiée avec un suivi clinique quotidien. 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

**9200** Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société sœur, leader mondial du diagnostic in vitro.

Suite à l'activation du système de la coagulation sanguine, le fibrinogène, molécule soluble substrat de la thrombine, est polymérisé en un caillot de fibrine. Le processus de fibrinolyse est activé concomitamment afin de réaliser la dégradation du réseau de fibrine par la plasmine. Ce processus clôtur la coagulation sanguine afin de re-perméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses. L'hémostase est donc un équilibre physiologique finement régulé entre un état de construction du caillot (coagulation) et de dissolution du caillot (fibrinolyse). Pour asseoir un diagnostic précis, lors d'évènements ischémiques ou hémorragiques, les cliniciens pratiquent des examens de biologie médicale en dosant différents paramètres de la coagulation comme le taux de prothrombine (TP, INR), le temps de céphaline activée (TCA), les produits de dégradation de la fibrine (PDF), la numération plaquettaire.

Un hybridome a été développé, il y a une vingtaine d'année, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique d'un produit terminal de la dégradation de la fibrine. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par la majorité des hôpitaux et des laboratoires français,

européens et américains pour le diagnostic de la CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée), des thromboses veineuses des membres inférieurs (phlébites) et de l'exclusion de diagnostic de l'embolie pulmonaire. Ces dispositifs IVD exploitant ce Mab sont pleinement validés, au sens du marquage CE des dispositifs IVD, de la U.S. FDA et des divers organismes réglementaires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé, techniquement et cliniquement validé que sur des lots issus de production en condition in vivo. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été menés depuis 2009 pour tenter le transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur, flasque, fibre creuse, roller-spinner...). L'ensemble des rapports techniques concernant la capacité dudit clone à produire le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition in vivo.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 1500 par cycle de production.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis 1995, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée par une technique éthiquement acceptable soit par asphyxie via une saturation progressive en CO<sub>2</sub>, soit par élongation.

**9201** L'objectif principal de ce projet de recherche fondamentale s'échelonnant sur cinq ans est de comprendre davantage les facteurs environnementaux, neuronaux et génétiques qui contribuent au développement des compétences sociales. Ce projet permettra de mieux comprendre comment ces facteurs interagissent pour permettre l'émergence des compétences sociales comme la reconnaissance et l'interprétation des expressions faciales. Il est crucial pour mieux comprendre les troubles développementaux comme par exemple les pathologies se caractérisant par des troubles du comportement social, notamment les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Les connaissances acquises permettront aussi la mise en œuvre de protocoles d'interventions chez des individus où un contexte d'expérience sociale atypique perturbe l'environnement social précoce comme, par exemple, lors de négligence ou de psychopathologie parentale.

Afin d'élucider quels facteurs contribuent au développement social précoce, ce projet portera sur les questions suivantes : (1) Quel est le lien entre le développement du cerveau et l'émergence du comportement social ? (2) Comment le développement du cerveau affecte-t-il la relation entre l'expérience sociale précoce (en particulier les interactions mère-nourrisson) et le comportement social ? (3) Comment les variations génétiques et hormonales influencent-elles les interactions entre l'environnement et les facteurs neuronaux dans l'émergence des compétences sociales ? (4) Comment la variabilité neurale, génétique et hormonale chez la mère influencent-elles la qualité des interactions précoces entre la mère et l'enfant ?

Les études animales permettent davantage de contrôle expérimental que celles effectuées chez l'humain. De plus, le rythme de développement des animaux est bien plus élevé et permet le suivi des changements développementaux sur une plus courte période que chez l'humain. Par conséquent, un modèle animal est mieux adapté pour étudier de façon longitudinale les interactions entre facteurs comme le développement du cerveau, les gènes et l'expérience sociale précoce dans l'émergence de la cognition sociale. Dans l'optique de répondre à ces questions, des mesures longitudinales du développement neuronal et comportemental seront effectuées au sein de deux cohortes de primates non humains (macaques rhesus). Des évaluations hormonales et génétiques seront aussi faites, car ces facteurs pourraient avoir un impact sur les liens entre cerveau et

comportement. Les macaques rhésus sont similaires aux humains en terme d'organisation sociale et cérébrale (notamment, ils sont beaucoup plus similaires aux humains que le sont d'autres espèces de primates non humains). De plus, les macaques nourrissons se développent à un rythme quatre fois plus rapide que les humains. Par conséquent, un modèle animal, et cette espèce en particulier (macaque rhésus) est particulièrement bien indiquée pour ce projet. La cohorte 1 (n = 56, c'est-à-dire 28 paires mère-nourrissons) inclura un groupe de paires mère-nourrisson macaques. Les mesures longitudinales du développement sociocognitif seront réalisées de manière non-invasive grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et à l'enregistrement des mouvements oculaires (eye-tracking). L'IRM et la tomographie par émission de positon (TEP) seront aussi utilisés chez les mères de cette cohorte pour explorer les changements cérébraux lors de la maternité. La cohorte 2 (n = 22) consistera en un groupe de macaques juvéniles. L'IRM et la TEP seront à nouveau utilisés pour explorer les facteurs neuronaux à des stades plus tardifs du développement que chez le nourrisson de la cohorte 1. Pour éviter le stress qui pourrait être associé à l'utilisation de l'IRM et de la TEP, les sujets seront endormis pendant les sessions d'enregistrement et seront continuellement surveillés. Le comportement social de l'ensemble des animaux au sein de leur groupe social habituel sera enregistré par vidéo avec l'objectif de coder manuellement la qualité des interactions entre individus. Le bien-être des animaux est de première importance. Ainsi, tous les animaux seront gardés en groupes sociaux pour permettre aux singes d'interagir. L'environnement des animaux sera enrichi afin de leur permettre de manifester leur répertoire comportemental complet et de s'engager dans des activités qui leurs sont significatives. De plus, tenant compte du fait que certaines paires mère-enfant et certains singes juvéniles prendront part aux procédures pilotes seulement, la taille des échantillons spécifiés ici correspond au minimum nécessaire à l'étude pilote tout en ayant assez de sujets pour explorer les relations entre tous les différents facteurs qui peuvent contribuer au développement du fonctionnement social, qui est plutôt complexe. En se basant sur notre expérience précédente, nous ne prévoyons aucun effet négatif pour les animaux inclus dans ce projet. Toutefois, tout stress pouvant être causé par la séparation du groupe social ou de la séparation de la mère et de l'enfant, sera minimisé et réglé le plus vite possible. Toutes les procédures sont légères ou de sévérité modérée. A la fin du projet, tous les animaux retourneront au lieu d'hébergement d'origine (qu'ils occupaient au début du projet) où les observations comportementales pourront continuer. Etant donné que le projet implique deux centres de recherche, il sera évalué par les comités d'éthique de chacun d'eux.

**9202** Les risques cardiovasculaires lié à une exposition chronique à faibles doses, comme dans les cas de situations post-accidentelles, ne sont pas encore clairs ; ceci est dû à la difficulté des études épidémiologiques de mettre en évidence une corrélation directe entre les effets biologiques et la dose délivrée au corps humain. Dans ce contexte il y a certaines questions qui sont soulevées au regard des maladies cardiovasculaires : Est-ce que les faibles doses de rayonnements ionisants induisent des effets sur le système cardiovasculaire? Si oui, est ce que cette réponse est délétère ou non?

Les résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent sur l'effet de faibles doses de rayonnements ionisants sur les pathologies vasculaires mettent en évidence que les très faibles doses n'entraînent pas de potentialisation de l'athérosclérose. L'objectif de notre étude va être d'identifier l'effet d'une exposition chronique à de faibles doses de rayonnements ionisants sur un autre processus vasculaire qui est le processus de néovascularisation. En effet, l'étude de la formation de nouveaux vaisseaux qui participe au maintien de l'irrigation tissulaire en réponse à une ischémie n'a jamais été étudiée après exposition chronique à faibles doses et pourrait être complémentaire aux études réalisées préalablement sur l'athérosclérose.

Pour cela différents groupes de souris C57BL/6J seront contaminées au <sup>137</sup>Cs par eau de boisson à différentes concentrations correspondant à de très faibles activités ne causant pas d'altération de l'état général de l'animal). Ce projet comprend 3 procédures utilisant au total 270 souris C57BL/6J.

La conception de ce projet répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est réduit mais suffisant pour exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique.

Les études in vitro présentent des limites pour l'évaluation de paramètres physiologique et/ou physiopathologique sur un processus tel que la néovascularisation après une exposition chronique à

faibles doses. Le processus de néovascularisation ne peut être évalué qu'après induction d'une ischémie tissulaire d'où la nécessité de recourir à une ischémie du membre inférieur. En effet, il est très difficile de maintenir des cultures cellulaires au-delà de 3 semaines dû au vieillissement cellulaire et aux cycles limités des cellules.

Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement viendra du fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et euthanasiés selon la réglementation en vigueur et les bonnes pratiques. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (anesthésie, analgésie notamment).

**9203** L'objectif de notre projet est de tester, selon un protocole adapté de la Pharmacopée Européenne (01/2015 : 2286), l'activité de 24 formulations contenant de la follicle stimulating hormone (FSH) afin de développer un produit vétérinaire agissant sur la maturation des ovaires. En effet, afin d'améliorer le bien-être des animaux de rente et de limiter le nombre d'injections de FSH chez ces animaux, les vétérinaires cherchent à développer des formulations de FSH qui seraient efficaces en une seule injection sous cutanée au lieu de trois actuellement.

Avant de réaliser ces tests d'efficacité, il convient de valider le test d'activité de la FSH décrit dans la Pharmacopée Européenne. Ce projet se déroule donc en deux temps : tout d'abord une validation du test qui sera reproduite une seconde fois afin de confirmer la validation du test sur 2 lots différents de FSH en utilisant 2 souches de rats différentes. Ensuite, sur 3 ans, 24 formulations seront testées par série de 3.

Pour la validation et les tests, le protocole est identique : les animaux (ratons femelles Sprague-dawley ou Wistar) sont reçus avec leur mère par portée de quatre ratons à l'âge de 12 jours. Ils sont sevrés à l'âge de 21 jours (retrait de la mère). A l'âge de 23 jours et pendant 3 jours, ils reçoivent par voie sous cutanée, 0.5 ml de FSH ou de véhicule. L'activité de la FSH est mesurée par pesée des ovaires après euthanasie des ratons effectuée 24 heures après la dernière injection sous-cutanée.

La validation complète nécessite l'utilisation de 16 mères et 64 ratons de souche Sprague-Dawley et 16 mères et 64 ratons de souche Wistar et le test des 24 formulations nécessite l'utilisation de 50 mères et 200 ratons de souche Sprague-Dawley ou Wistar soit un total de 410 animaux (82 mères et 328 ratons).

Ces animaux sont stabulés dans une animalerie climatisée, à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $50 \pm 20\%$ , et ils sont soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00). Ils ont accès à une nourriture standard (M20) et de l'eau fournis ad libitum et disposent fibres de coton Cell Best SP comme dispositif d'enrichissement. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation de 11 jours. Lors du sevrage, un raton de chaque portée est réparti dans chaque groupe de traitement.

Pour la validation du test réalisé 2 fois pour chaque souche de rats, les groupes expérimentaux sont les suivants (n=8) : - Groupe 1 : Véhicule ; - Groupe 2 : FSH étalon 1.5 UI ; - Groupe 3 : FSH étalon 3 UI ; - Groupe 4 : FSH étalon 6 UI. Composition du véhicule : solution saline tamponnée phosphate albumine (ajustée à pH 7.2), contenant 0.2 g/L de thiomersal et 40 UI/ml de gonadotrophine chorionique.

Pour l'évaluation de l'activité des formulations contenant de la FSH à tester, les groupes expérimentaux sont les suivants (n=5) : - Groupe 1 : FSH étalon X UI (X à déterminer après la phase de validation) avec 1 injection quotidienne pendant 3 jours consécutifs ; - Groupes 2 à 4 : Formulations A à C contenant  $3 \times X$  UI de FSH ; - Groupe 5 : FSH étalon  $3 \times X$  UI en une unique injection (ce nouveau groupe à pour vocation de contrôler les effets d'une délivrance unique de FSH en comparaison avec la délivrance de FSH présente dans les formulations à tester)

Ce protocole sera reproduit 8 fois afin de tester 24 formulations (de A à X).

En fonction des résultats obtenus lors du test des 3 premières formulations sur chacune des 2 souches de rats, le groupe 5 ne sera pas maintenu si ses résultats n'apportent pas de valeur ajoutée aux résultats, ainsi le nombre d'animaux utilisé sera moindre.

Remarque : les 24 formulations testées ont fait l'objet d'évaluations en matière d'innocuité (tests de toxicité) et les doses utilisées seront donc des doses non toxiques.

A partir de l'âge de 23 jours, après randomisation, les animaux reçoivent pendant 3 jours consécutifs une injection sous-cutanée de 0.5 ml de véhicule ou de FSH ou d'une formulation contenant de la

FSH (Procédure 1). Pour le test des formulations (A à X), une seule administration de la formulation à tester ou de FSH étalon est réalisée, les deux autres jours, l'animal reçoit du véhicule pour avoir un protocole similaire au groupe FSH de la validation du test et pour respecter le protocole de la Pharmacopée Européenne. Vingt-quatre heures après la dernière administration, les rats sont euthanasiés par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique et leurs ovaires prélevés. Les animaux sont pesés à J23 lors de la randomisation puis le jour de l'euthanasie à J26.

Les animaux seront placés à 4 (validation du test) ou 5 (test des formulations) par cage pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, et si des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ceux-ci seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro (remplacement) mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs (réduction).

**9204** A la Réunion, l'omniprésence du moustique « tigre » (*Aedes Albopictus*), vecteur des virus du Chikungunya et de la Dengue maintient à un niveau élevé le risque d'émergence de ces arboviroses. Les enquêtes entomologiques envisagées s'inscrivent dans le cadre d'un projet de recherche mis en place depuis 2009. La réussite de la phase pilote de démonstration de l'efficacité de la lutte est conditionnée par la nécessité de déterminer en amont les indicateurs entomologiques caractéristiques des populations locales d'*Aedes Albopictus* et les facteurs environnementaux permettant de prédire la dynamique. Ainsi le principal objectif des enquêtes de pré-lâchers est de caractériser la dynamique saisonnière des populations naturelles, et leur densité par unité de surface et à des périodes clés de l'année, et en particulier par des méthodes de « Marquage-Lâcher-Recapture » (MLR) couramment utilisée en écologie pour étudier leur comportement des populations de moustique. Les techniques de MLR avec des insectes consistent à relâcher des individus marqués, généralement avec des colorants fluorescents, suivis de la recapture quotidienne plusieurs jours après avoir laissé suffisamment de temps pour que les insectes relâchés se dispersent. Généralement, l'échantillonnage est basé sur l'utilisation des pièges, mais une méthode inadéquate d'échantillonnage conduirait à une estimation biaisée de la taille réelle de la population. Le piège BG-sentinelle, disponible dans le commerce, est suffisamment efficace pour attirer les femelles d'*Aedes albopictus* et constitue une alternative aux captures de moustique directement sur hommes adultes. Il a été récemment prouvé que la présence de souris vivantes (ou leurs odeurs en combinaison avec le CO<sub>2</sub>) placées dans le piège BG augmente considérablement la probabilité d'échantillonnage de moustiques mâles même à des faibles niveaux d'abondance (remplacement). Ici, quatre (04) d'expériences de marquage-lâcher-recapture (MLR) seront réalisées à différentes saisons (de 2018 à 2019) avec des échantillons mâles d'*Aedes albopictus* provenant de colonies élevées en laboratoire et des mâles issus d'œufs prélevés sur le terrain, pour obtenir des estimations de densité de population et leur dispersion.

Pour chaque enquête, la procédure d'échantillonnage des moustiques consistera en un total de 20 pièges sentinelles BG appâtés chacun avec 3 souris vivantes (il a été prouvé que ce nombre est le nombre optimum dans l'équilibre balance /dommage) avant d'être déployées dans la zone d'étude. Le piège BG se présente sous forme de cylindre pliable (40 cm de haut, 36 cm de diamètre), fermé à sa base et recouvert d'un filet à son extrémité supérieure. Au milieu du cylindre se trouve un entonnoir rectangulaire (15 cm) équipé au fond d'un petit ventilateur alimenté par une batterie de 12V rechargeable. L'air brassé par le ventilateur permet également de souffler vers le haut l'odeur du lure (placé du côté extérieur de l'entonnoir). En s'échappant à travers le filet formant le couvercle du cylindre, cette odeur attire des moustiques qui sont ensuite aspirés par un flux d'air qui souffle vers le bas dans un entonnoir rectangulaire équipé d'un sac de collecte d'insectes en toile à mailles fines. Le piège a été modifié pour augmenter son efficacité, notamment dans la capture des mâles de moustiques, en y associant un appât animal dans une cage contenant 3 souris de laboratoire. Le

nombre de souris requises pendant l'étude est de 60 à chaque essai (20 sites de piégeage à chaque fois). Chaque essai de MLR de terrain est prévu pour une semaine de travail : soit 4 jours consécutifs de capture.

Il y aura donc 4 campagnes de piégeage sur 20 sites à chaque fois ce qui fait un total de 240 souris. Les souris OF 1 mâles et femelles proviennent de l'élevage d'une animalerie de recherche agréée et seront hébergées le temps de l'élevage dans des conditions de température et d'hygrométrie optimales selon la réglementation Européenne. Pendant ce temps, les souris sont placées dans une cage d'élevage en polycarbonate (dimensions : 265x205x140mm), muni d'une litière, d'un biberon et de la nourriture et d'un abri de type igloo. La grille de la cage est fixée et la cage et les souris sont placées directement dans le fond du piège BG-Sentinelle. Ici, les pièges sont placés au niveau du sol dans un endroit ombragé très près des zones domestiques, et espacés de 50 à 100 m. Suivant le mode de piégeage de moustiques décrit ci-dessus, les souris ne sont jamais en contact avec les moustiques et sont totalement protégées des insectes à l'intérieur du piège-sentinelle.

L'utilisation de cages d'élevage de souris, au lieu des dispositifs de contention, permet de diminuer le stress et d'assurer le bien-être des animaux pendant la durée de l'expérience. La litière, l'eau et les granulés sont contrôlés et changés tous les jours. Les souris utilisées comme appât dans l'étude envisagée seront manipulées par une personne qualifiée qui a les compétences nécessaires en manipulation animale et ayant acquis le niveau 2 en expérimentation animale.

**9205** Le contexte clinique de notre projet concerne le traitement des tumeurs cérébrales, et repose plus particulièrement sur l'amélioration des traitements actuellement disponibles par radiothérapie, à l'aide de nanoparticules métalliques.

Le but de ce projet est d'évaluer la progression tumorale (croissance tumorale et envahissement du tissu cérébral sain) lorsque les tumeurs sont traitées par radiothérapie, associée à des nanoparticules métalliques. En effet, les nanoparticules sont capables d'amplifier localement les dégâts causés sur les cellules cancéreuses par l'irradiation, constituant ainsi une stratégie thérapeutique potentielle. Les résultats de ce travail in vivo permettront donc de proposer de nouvelles modalités thérapeutiques adaptées aux tumeurs cérébrales.

Après avoir validé in vitro sur des modèles cellulaires simples l'intérêt de nos nanoparticules, il est nécessaire de caractériser et d'optimiser leur utilisation in vivo, avant de pouvoir proposer ces nouvelles stratégies de traitements en clinique humaine.

Pour ce faire, des souris immunodéprimées recevront une greffe intracérébrale de cellules cancéreuses (sous forme de sphéroïdes fluorescents) et recevront, ou non, un traitement par nanoparticules et/ou une irradiation (en monodose ou doses fractionnées). Lors de l'implantation du sphéroïde, une fenêtre crânienne (=lamelle de verre) sera mise en place, permettant ainsi d'observer l'évolution de la tumeur par microscopie.

Le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'efficacité des thérapies anticancéreuses dépend, chez l'animal comme chez l'Homme, de phénomènes complexes (inhérents à la physiopathologie cancéreuse d'une part, et, au comportement des nanoparticules en milieu biologique d'autre part) qui ne peuvent pas être appréhendés dans leur globalité sur des modèles cellulaires in vitro.

Cette étude nécessitera au maximum 139 souris immunodéprimées. L'intérêt du modèle de fenêtre crânienne est de pouvoir suivre sur un même animal l'évolution tumorale au cours du temps, et ainsi, de réduire le nombre d'animaux utilisés pour apprécier l'efficacité des traitements. En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation du sphéroïde, irradiation), et euthanasiées dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

**9206** Afin d'étudier les mécanismes biologiques complexes qui régulent le développement et le fonctionnement des mammifères, la souris est un modèle privilégié, autant pour sa facilité d'élevage que pour sa proximité avec l'homme.

Les recherches scientifiques sur ce champ s'appuient ainsi depuis de nombreuses années sur les souris modifiées génétiquement. Aujourd'hui, une nouvelle technique d'édition du génome, appelé

CRSIPR/Cas9, permet d'obtenir plus facilement de nouveaux modèles d'études murins. Par rapport aux techniques précédentes (Transgénèse par cellules ES), nous pouvons obtenir des animaux expérimentaux plus rapidement, notamment en évitant les animaux chimères, qui nécessite la génération de souris F1 supplémentaire.

La Fédération de Recherche qui m'emploie a donc mis en place un plateau commun pour développer des modèles de souris transgéniques à partir de cette nouvelle technologie.

Le but est d'utiliser un complexe RiboNucleoProteique (RNP) pour venir modifier le génome de la souris dès le stade 1 cellule, permettant d'obtenir rapidement et facilement les modifications souhaitées.

L'injection du complexe RNP dans les embryons se fait donc dès la fécondation (zygote).

Le nombre de projets est fonction de la demande des laboratoires. Le plateau peut générer au maximum 5 lignées/ an. Ainsi, le nombre maximal d'animaux maximum sur 5 ans sera de 880 souris (600 femelles donneuses + 200 femelles porteuses + 30 mâles fertiles + 50 mâles vasectomisés). Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, cette nouvelle technique permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'une lignée transgénique, grâce à une grande efficacité. Le nombre d'animaux nécessaire est fonction de la réussite des manipulations. Si une lignée transgénique est obtenue rapidement, le nombre de femelles sera revu à la baisse.

Enfin, la souffrance et/ou le stress des animaux est présent lors des injections hormonales (en intrapéritonéal) et lors de la réimplantation des embryons dans les femelles porteuses.

Pour réduire la souffrance lors de la chirurgie de réimplantation, un analgésique a été testé mais les résultats n'ont pas été concluants.

C'est pourquoi, une nouvelle étude avec d'autres analgésiques va être mise en place afin de réduire au maximum la souffrance animale tout en conservant des résultats compatibles avec les objectifs scientifiques.

Pour cela, une surveillance post-opératoire des animaux sera effectuée afin d'évaluer la souffrance, puis le nombre de naissances sera mis en rapport avec le traitement afin d'en évaluer l'impact sur la gestation.

**9207** A l'heure actuelle, le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques représente un problème important de santé publique. Ces bactéries résistantes peuvent notamment être des bactéries qui colonisent le tube digestif et constituent avec d'autres micro-organismes le microbiote intestinal.

L'objectif de ce projet est de développer une alternative aux traitements antibiotiques existants afin de traiter une pathologie d'origine bactérienne chez l'Homme tout en limitant l'apparition de résistances au niveau du tube digestif. L'alternative proposée est d'associer deux antibiotiques existants entre eux plutôt que de traiter les patients avec un seul antibiotique. En effet, des études in vitro ont montré que l'association d'antibiotiques pouvait limiter l'apparition de résistances bactériennes.

Pour cela, la pharmacocinétique de deux antibiotiques seuls ou en association (première partie du projet) ainsi que le niveau d'apparition de résistances au niveau du tube digestif (seconde partie du projet) seront étudiés chez le porc. En effet, le porc est un bon modèle pour l'Homme en ce qui concerne la flore digestive.

Vingt porcs seront utilisés pour la première partie du projet. Ils seront répartis en 5 lots de 4 porcs recevant des administrations répétées respectivement de l'antibiotique 1 seul, de l'antibiotique 2 seul à une faible dose, de l'antibiotique 2 seul à une forte dose, de l'antibiotique 1 associé à l'antibiotique 2 à la faible dose, ou de l'antibiotique 1 associé à l'antibiotique 2 à la forte dose. Le but de cette première partie sera de déterminer quelle dose de chaque antibiotique, lorsqu'ils sont administrés ensemble, permet de reproduire les concentrations plasmatiques observées chez l'Homme en milieu hospitalier lors d'une administration dissociée. Pour cela, les concentrations plasmatiques de chaque antibiotique seront déterminées du premier au dernier jour d'administration. Le nombre de porc par groupe nécessaire pour mener à bien ce projet a été déterminé par un calcul de puissance statistique pour 3 paramètres pharmacocinétiques (résultats,  $n = 3.04, 4.02$  et  $4.58$ ) à partir de données obtenues sur des patients traités avec l'antibiotique 2.

Huit porc seront utilisés pour la deuxième partie du projet. Le but de cette seconde partie sera de déterminer le niveau d'apparition de résistances bactériennes au niveau du tube digestif. Tous les animaux recevront une administration intraveineuse de l'association des deux antibiotiques à la dose choisie à la fin de la première partie du projet. Avant et après traitement, des prélèvements de fèces seront réalisés par stimulation digitale de l'ampoule rectale. Dans la première partie du projet, il y aura 2 mâles et 2 femelles par groupe, aucun effet sexe n'étant décrit pour la pharmacocinétique des deux antibiotiques. Cependant, compte tenu d'une possible grande variabilité interindividuelle dans le microbiote fécal et notamment d'un possible effet sexe rapporté récemment, le double d'animaux sera prévu par sexe dans cette seconde partie, soit 4 mâles et 4 femelles.

Il n'est pas possible de se passer d'animaux pour ce projet car le devenir d'un médicament dans un organisme n'est pas prévisible par des études in vitro compte-tenu de la complexité des mécanismes. Cependant, l'évaluation de l'efficacité des différents traitements sera réalisée indépendamment sur un modèle in vitro pour éviter l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux ou d'animaux malades. Les porcs seront hébergés en groupe à leur arrivée. Ils seront placés en boxes individuels lors des prélèvements de sang pour des facilités de manipulation notamment lors des perfusions (première partie) ou lors des prélèvements de fèces après administration de l'association d'antibiotiques afin d'éviter un transfert de bactéries résistantes d'un porc à l'autre (deuxième partie). Les boxes permettront aux porcs de se sentir, s'entendre et se voir. Ils seront équipés de balles à mâcher suspendues à des chaînes en inox. Les animaux seront observés au moins 1x/j, y compris weekend et jours fériés.

**9208** Le cancer gastrique est le 4<sup>e</sup> cancer le plus fréquent et la 2<sup>e</sup> cause de mortalité par cancer dans le monde. Au cours des dernières années un type de cancer gastrique agressif ne cesse d'augmenter en France. Différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées pour améliorer la survie des patients présentant ce type de cancer gastrique agressif. La chimiothérapie péri-opératoire les médicaments anticancéreux (cisplatine, oxaliplatine) est le traitement de choix en Europe. Malheureusement, la durée médiane de survie de ces patients est seulement de 6 à 9 mois, ce qui résulte principalement du diagnostic tardif, de l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et du manque de cibles moléculaires pour l'application ou le développement de thérapies ciblées.

Ce projet vise à :

1) Mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le développement des cancers gastriques et leur fréquente résistance à la chimiothérapie en étudiant et en établissant des modèles de souris différents.

2) Développer de nouveaux composés anticancéreux contenant différents métaux et traitements combinatoires qui montrent une meilleure efficacité contre le cancer, et qui provoquent en même temps moins ou pas de mécanismes de résistance aux médicaments et d'effets secondaires.

La règle des 3R s'appliquera à l'ensemble des procédures expérimentales du projet.

L'initiation, la progression et l'agressivité des cancers gastriques ne peuvent être étudiées dans l'organisme entier qu'en tenant compte de la physiologie de l'animal et la durée de la maladie. De plus, même si nous avons d'abord largement testée les nouveaux composés sur les lignées cellulaires cancéreuses différentes, leur toxicité, leur activité in vivo contre le développement du cancer et de leurs effets secondaires ne peuvent être étudiées qu'avec l'aide de modèles animaux. Le projet nécessitera un nombre maximum 666 souris. Elles seront hébergées dans des conditions sanitaires contrôlées et de bien-être optimal (ex : carrés de coton pour la fabrication des nids, balançoires) et surveillés quotidiennement. S'il y a apparition de signes de souffrance, les animaux seront traités contre la douleur (ex : kétophène) ou euthanasiés si leur état le nécessite.

La réalisation de ce projet devrait permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique des cancers de l'estomac.

**9209** Les ovins sont une espèce saisonnière qui connaissent une alternance entre une saison sexuelle où les femelles présentent des cycles ovariens ponctués par des ovulations et une saison de repos sexuel où l'ovaire est au repos. Ainsi, lors de la saison de repos sexuel, il n'est pas possible de mettre "naturellement" les animaux à la reproduction, ce qui pose des problèmes importants dans les



systèmes de production animale. Pour contourner ce problème, les filières d'élevage utilisent des traitements hormonaux exogènes. Cependant ceux-ci ne vont pas sans utiliser un certains nombres de problèmes sanitaires, environnementaux et d'acceptation sociale. Néanmoins, il existe une possibilité d'induire l'ovulation en saison de repos sexuel en utilisant les interactions sociales, c'est "l'effet mâle." Ainsi, l'introduction d'un mâle au sein d'un groupe de femelles en repos ovulatoire peut déclencher cette ovulation. De manière intéressante, il a été montré que les stimulations olfactives provenant du mâle sont les plus efficaces pour induire cette ovulation. Dans un contexte de développement plus durable des productions animales, nous avons identifié un certain nombre de molécules produites par le bélier en saison sexuelle et qui pourraient induire l'ovulation. Nous voulons donc tester l'efficacité de ces molécules olfactives en mesurant la réponse ovulatoire suite à leur présentation et via la mesure de la libération de différentes hormones dans le sang. Ce programme s'étalera sur au moins 3 ans où nous serons amenés à tester 20 groupes de 10 animaux, soit un total de 200 brebis.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : la complexité de la réponse physiologique étudiée ne peut pas être remplacée par des systèmes alternatifs

Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire, tout en conservant une bonne mise en évidence statistique

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe social sur paille

**9210** Nous souhaitons élucider les mécanismes neurobiologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire impliqués dans la formation et la stabilisation des souvenirs chez le rongeur. Dans les études sur la mémoire, il n'est pas possible de remplacer le modèle animal par des méthodes de substitution. Le bien-être des animaux, engagés dans un test comportemental est crucial; leur suivi est quotidien, de leur arrivée à la fin de l'expérience. Nous nous intéressons tout particulièrement à l'interface entre l'hippocampe et le cortex qui jouent un rôle clé dans ces processus. Ainsi, des rats sont soumis à un test cognitif permettant d'appréhender les différents processus de la mémorisation (encodage, consolidation et rappel des souvenirs). Ce projet portant sur l'activité des réseaux neuronaux et vasculaires au cours des processus mnésiques, le modèle d'étude employé doit permettre de reproduire un système biologique fonctionnel et intégré au vivant. L'expérimentation chez l'animal, ici le rat, constitue donc un outil incontournable. Ce projet veut révéler la plasticité vasculaire cérébrale par angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) qui soutient l'activité neuronale lors des processus mnésiques. Les rats seront testés pour leur mémoire récente (1 jour) ou ancienne (30 jours), puis leurs cerveaux seront collectés pour analyser les modifications de différents marqueurs neurobiologiques et vasculaires induites par les activités mnésiques. Par une approche invasive qui consiste à augmenter ou diminuer la densité des réseaux vasculaires ou l'activité neuronale, nous serons en mesure de définir un lien de causalité entre l'efficacité des réseaux vasculaires et l'activité neuronale, support biologique de la mémoire. Le raffinement des protocoles qui consiste à agir directement sur la cible choisie par l'injection intracérébrale, permettra de réduire le nombre d'animaux (réduction de 15 à 9 animaux/groupe avec une précision statistique robuste et fiable ; chaque expérience comprendra deux lots de 9 animaux traités et deux lots de 9 animaux contrôles, soit 36 rats). Après implantation chirurgicale, sous anesthésie générale, de canules permettant l'injection d'agents pharmacologiques modulateurs de l'angiogenèse dans les régions cérébrales spécifiques impliquées dans l'encodage (hippocampe) et la consolidation des souvenirs (cortex), nous utiliserons le test de la transmission sociale de préférence alimentaire. La douleur post-chirurgicale sera prise en compte par un suivi analgésique. Basé sur l'observation éthologique du comportement social du rat et non-aversif, il est peu source de stress pour l'animal. Cette étude fondamentale devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux mécanismes favorisant les processus de mémorisation, sur lesquels il sera possible d'agir pour ralentir les déficits observés dans des pathologies neurodégénératives (Alzheimer, démences vasculaires). Le projet proposé nécessitera un total de 900 animaux sur 3 ans, soit 300 animaux par an.

**9211** Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 200 protocoles, représentant 1000 souris.

Le temps d'immunisation des souris sera de 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Au cours du processus d'immunisation, des échantillons

de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9212** Une des capacités les plus impressionnantes du cerveau est sa faculté constante à apprendre et acquérir de nouvelles compétences, à intégrer de nouvelles expériences et à former des souvenirs. Il est admis que des changements dans les connexions synaptiques entre les neurones jouent un rôle-clé dans l'apprentissage et la mémoire. Le stockage à long terme des informations et leur stabilisation nécessitent une réorganisation au sein de réseaux neuronaux, avec notamment la formation de nouvelles synapses, régions de contact entre 2 neurones. Ainsi, la constitution d'un souvenir se joue dans la dynamique d'opérations impliquant l'hippocampe, une structure clé de l'apprentissage/mémoire et des structures corticales qui vont conduire au renforcement des connexions, notamment dans le cortex préfrontal médian (CPFm). Sur la base des données anatomiques et fonctionnelles, les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) situés sur la ligne médiane ventrale du thalamus pourraient être un relai important dans le transfert d'informations du CPFm vers l'hippocampe. Chez l'Homme, les amnésies diencephaliques (atteintes du thalamus) sont caractérisées par des déficits ressemblant à ceux observés dans les amnésies du lobe temporal (atteinte de la région de l'hippocampe) ou celles impliquant le CPFm, ceci en fonction de la localisation de la lésion dans le thalamus, une région étendue comprenant plus de 60 noyaux. Les troubles de la mémoire pourraient donc être en relation avec la perte des connexions entre l'hippocampe et le CPFm, ou la perte de la contribution des noyaux du thalamus lésés aux processus de mémorisation. La mise en évidence de l'implication des noyaux ReRh dans la formation d'une mémoire spatiale ancienne (quelques semaines), mais pas récente (quelques jours) chez le Rat a permis de proposer pour la 1<sup>ère</sup> fois que la formation/persistance d'un souvenir spatial impliquerait un circuit cérébral formé par l'hippocampe, le cortex préfrontal médian et les noyaux ReRh du thalamus. L'objectif global du projet est de poursuivre ces travaux et d'étudier en détail ce circuit essentiel à la formation et la persistance d'un souvenir. Pour cela, seront utilisés plusieurs approches d'inactivation réversibles (soit la mise sous silence d'une région cérébrale de manière temporaire) et de lésions permanentes ciblant les projections spécifiques entre le cortex préfrontal médian, les noyaux ReRh et l'hippocampe et d'en observer les conséquences sur la formation ou le rappel d'un souvenir spatial chez le Rat. Le projet inclut 392 rats mâles adultes de la souche Long Evans. Les expériences prendront en compte la règle des 3R : le 1<sup>er</sup> 'R' 'réduire' le nombre d'animaux en fonction des traitements (rats expérimentaux opérés [inactivation pharmacologique ou pharmacogénétique [injection vecteurs viraux ou enzyme] vs rats témoins opérés [Sham]) pour obtenir une puissance statistique suffisante soit 12 rats /groupe et 16 rats/groupe pour l'implantation d'une canule dans les noyaux ReRh. Le 2<sup>e</sup> 'R' 'raffiner' en réduisant au maximum la douleur (chirurgie sous anesthésie profonde, soins anti-inflammatoires, suivi post-opératoire), le stress ou l'angoisse avec notamment une très bonne habituation des rats aux expérimentateurs et au test comportemental. Ils seront hébergés à 2 par cage avec un bâton à ronger comme enrichissement du milieu. Le 3<sup>e</sup> 'R' Remplacer' : pour l'étude des processus neurobiologiques de la mémoire, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle *in silico* et le rat est un modèle de choix très bien validé.

**9213** Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes et qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Une partie des recherches actuelles se concentre sur la mise au point de vaccins qui, en stimulant le système immunitaire, préviendraient de l'infection (vaccin préventif) ou aiderait le malade à lutter contre l'infection (vaccin thérapeutique). Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas encore de tels vaccins capables. Pour identifier les composantes du vaccin capables d'activer le système immunitaire plusieurs équipes européennes parmi les plus compétitives impliquées dans ces recherches joignent leurs forces dans un nouveau programme. Il s'agira d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux de la vaccination afin de définir la manière la plus efficace d'induire une réponse. De

plus, les réponses à la vaccination sont des mécanismes complexes qui combinent à la fois des réponses par les anticorps mais aussi des réponses cellulaires, notamment les cellules de la peau, dites cellules dendritiques, spécialisées dans l'initiation des réponses de l'hôte aux pathogènes.

Le projet présenté ici s'attache à évaluer des candidats vaccins les plus avancés qui auront été auparavant strictement sélectionnés *in vitro* et chez le rongeur. A ce stade, aucun dispositif *in vitro* ou *in silico* ne peut reproduire la complexité d'une réponse immunitaire *in vivo*, il est nécessaire de recourir aux modèles animaux. Le modèle primate non humain (PNH) a été choisi pour ce projet, car c'est le seul modèle animal susceptible à l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne, seul modèle reconnu à l'heure actuelle de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 40 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. De plus, pour éviter d'augmenter le nombre d'animaux inutilement, des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, imagerie, prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés.

En cas d'apparition d'effets inattendus ou points limite prévus dans le projet, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements contigus permettant des interactions sociales et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

**9214** Afin de pouvoir réaliser des prestations d'imagerie par angiographie et par imagerie de flux cardiaque, il nous est nécessaire de réaliser des optimisations techniques.

Dans ce cadre, nous envisageons de mettre au point un suivi par angiographie de la vascularisation cérébrale avec le constructeur de l'angiographe qui vient d'être livré sur le site. Le constructeur prévoit deux séances de formation pour les utilisateurs.

D'un autre côté, des demandes de prestations en imagerie de flux cardiaque ont fait que nous ayons eu besoin de faire des mises au point en imagerie par IRM. Il est nécessaire maintenant de confirmer chez l'animal que les séquences prévues correspondent bien à une imagerie de flux cardiaque chez le cochon, comme demandé par notre prestataire.

Pour ces deux mises au point, nous envisageons d'utiliser un maximum de deux cochons.

Afin de respecter la règle des trois R, les procédures expérimentales prévues dans le cadre de cette recherche ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum, selon les calculs d'effectifs effectués en s'appuyant sur des études précédentes, et des tests statistiques appropriés seront utilisés afin de mettre en évidence les résultats attendus.

Dans un souci de raffinement, le long de l'expérience, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Les examens d'imagerie dont bénéficient ces animaux sont non invasifs et les procédures menées dans ce projet se réalisent sous anesthésie générale avec ventilation assistée et contrôle des paramètres physiologiques.

Un cathéter percutané est placé dans une veine de l'oreille pour avoir un accès continu pour l'administration des drogues. Un cathéter artériel sera utilisé pour l'imagerie par angiographie afin d'injecter le contraste nécessaire.

En péri-opératoire, l'analgésie est assurée par injection de buprénorphine 15 min avant le réveil de l'animal répétée 12h post-chirurgie.

Même si les procédures ne sont pas invasives, si l'apparition de critères s'avèrent, l'euthanasie est prévue, en adéquation par rapport à l'espèce et au poids et se fait sous anesthésie profonde.

Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel formé 7j/7. Les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation d'une semaine avant les examens d'imagerie afin de s'habituer à leur nouvel hébergement et diminuer le stress. Ils seront hébergés dans des box

conformes aux normes européennes et bénéficient d'un environnement climatisé à 21°C avec un cycle jour nuit 7h/19h et accès ad libitum à des croquettes et l'eau.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à l'euthanasie de l'animal.

**9215** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 1100 protocoles, représentant 2200 Lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de

21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9216** Chez les ovins, l'insémination animale consiste à déposer par voie non chirurgicale de la semence au niveau du col de l'utérus d'une brebis en chaleur. Cette méthode permet d'obtenir de bons résultats de fertilité avec de la semence conservée jusqu'à 10 h à 15°C (50-70 % de brebis gestantes) mais pas avec de la semence congelée (10 %). Ceci est lié, pour des raisons encore mal connues, à la perte par les spermatozoïdes congelés de l'aptitude à franchir le col de l'utérus. Le col de l'utérus de brebis est couvert d'un mucus qui effectue une sélection efficace des spermatozoïdes. Seuls 1 % des spermatozoïdes déposés dans le vagin atteindront l'utérus. Il est probable que les spermatozoïdes congelés soient incapables de franchir le col car ils ne peuvent pas traverser ce mucus. L'impossibilité de réaliser des inséminations avec de la semence congelée est un handicap majeur pour la filière ovine avec la nécessité de disposer de larges troupeaux de béliers pour fournir de la semence fraîche durant la courte période de reproduction (1-2 mois par an). Pour des raisons d'organisation et de taille des troupeaux (500 brebis par éleveur), les chaleurs sont synchronisées avec un traitement hormonal pour regrouper les chaleurs et réaliser l'insémination par groupes de brebis (généralement 50). L'impact de ce traitement de synchronisation sur les propriétés du mucus est mal connu mais une augmentation de la viscosité et donc une réduction de l'aptitude des spermatozoïdes congelés à traverser le mucus est envisagée. Par ailleurs, il existe de fortes différences de fertilité entre races de brebis avec en particulier l'existence de deux races norvégiennes de haute fertilité (60-70 %) après insémination avec de la semence congelée sans réelle explication. Dans le cadre d'un projet européen de développement durable de l'agriculture, 6 races de brebis européennes (Norvège, Irlande, France) sont comparées pour tirer parti de leurs caractéristiques reproductives et améliorer la fertilité après insémination. La mise en évidence éventuelle de différences entre les races de brebis permettrait de mieux comprendre la physiologie du col de l'utérus et proposer des solutions pour l'insémination avec de la semence congelée. L'objectif de cette étude est de collecter du mucus cervical de 2 races de brebis de fertilité différente (race Romanov très fertile vs race Ile de France peu fertile) dans deux types de cycles (spontanés ou synchronisés par un traitement hormonal). Les mucus seront soumis à des analyses approfondies (caractéristiques physiques (viscosité) et chimiques (composition en protéines et petites molécules)). Cette étude consiste à collecter du mucus cervical de 60 brebis (30 brebis par race) à deux moments du cycle (œstrus et phase lutéale) pendant 3 cycles spontanés puis 3 cycles synchronisés. La détection de l'œstrus pendant les cycles spontanés sera réalisée à l'aide de 6 béliers utilisés individuellement et quotidiennement pendant 6 jours par cycle. Le mucus sera collecté par une légère aspiration avec un cathéter de 3 mm de diamètre. Un volet complémentaire du projet consiste à tester l'effet d'un traitement oral muco-fluidifiant sur la viscosité du mucus sur un groupe supplémentaire de 20 brebis. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude (86) et les procédures expérimentales ont été choisis afin de respecter au maximum les pratiques des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement). Réduction : Les effectifs d'animaux ont été réduits au minimum pour évaluer les caractéristiques du mucus d'une population de brebis. Remplacement : Le mucus cervical est un mélange complexe de sécrétions du tractus reproducteur femelle sous contrôle hormonal, qui doit collecté sur animal vivant. Raffinement : Les brebis sont logées en bâtiment conventionnel sur aire paillée avec accès au pâturage, en visibilité et contact des congénères. Les brebis seront prélevées sur le site d'élevage afin d'éviter tout stress de déplacement et modification d'hébergement.

**9217** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les transferts de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité.

L'effectif des animaux engagés dans chaque protocole est établi en corrélation avec la quantité d'immun-sérum à produire et selon les rendements précédemment obtenus. En se basant sur ces données, nous faisons une demande pour 25 protocoles, représentant 500 lapins.

Le temps d'immunisation est de 357 jours. Cette durée permet l'obtention d'une grande quantité d'anticorps spécifiques à un lot composé de plusieurs lapins.

Les immun-sérums récupérés sont ensuite purifiés par le client afin de récupérer les anticorps reconnaissant spécifiquement l'antigène d'intérêt. Ces anticorps sont produits en grande quantité pour entrer dans la fabrication de trousse de diagnostic à grande échelle.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant

l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9218** Les pathologies des tendons et des ligaments sont fréquentes et responsables de troubles locomoteurs importants lorsqu'elles sont mal soignées. Elles peuvent entraîner à long terme de l'arthrose et une diminution des capacités motrices chez le patient atteint.

Des études ont montré que ces pathologies étaient souvent mal diagnostiquées et négligées, engendrant une cicatrisation précaire. Le traitement d'une rupture d'un tendon ou d'un ligament est souvent délicat et demande la plupart du temps une chirurgie réparatrice. Cependant la cicatrisation est souvent lente et incomplète, étant donné que les tendons et ligaments sont des structures anatomiques souvent sollicitées avec une faible vascularisation.

Les techniques d'ingénierie tissulaire sont en pleine expansion et offrent des alternatives potentielles. Les scaffolds (matrices) associés ou non à des facteurs de croissance semblent être une voie thérapeutique très intéressante pour les cicatrisations tendineuses et ligamentaires. En effet le design et la fabrication des scaffolds permettent de se rapprocher le plus possible des structures d'origine, en offrant les propriétés intrinsèques quasi équivalentes : résistance, porosité, élasticité. Ainsi les cellules réparatrices peuvent aisément coloniser le scaffold et y loger pendant tout le processus de cicatrisation.

Une équipe mauricienne développe des nano scaffolds (matrices) à base de substances naturelles comme l'Aloe Vera et la canne à sucre, avec un enrichissement en protéines de collagènes, principal constituant des tendons. Les études in vitro montrent une absence de toxicité et une excellente biocompatibilité, ainsi que des propriétés mécaniques très proches de celles des tendons.

Cependant nous devons effectuer des études in vivo pour mettre les scaffolds à l'épreuve sur un organisme vivant avec toutes les tensions/pressions/étirements qu'il génère.

Nous proposons d'utiliser les scaffolds pour améliorer la cicatrisation d'une section du tendon d'Achille chez le rat. Pour cela nous utiliserons des rats adultes Wistar.

Le tendon d'Achille est le plus long et le plus robuste des tendons de l'organisme chez le rat, mais aussi chez l'Homme. Le modèle de section du tendon d'Achille est connu et bien décrit dans la littérature. Notre équipe possède une bonne expertise de la chirurgie tendino-ligamentaire et nous avons dans notre laboratoire tout le matériel nécessaire pour réaliser les modèles animaux : appareil d'anesthésie gazeuse, microscopes chirurgicaux, plateaux chauffants, instruments de microchirurgie. Les deux expérimentateurs qui effectueront la procédure chirurgicale possèdent une bonne expérience en chirurgie. Nous utiliserons 3 rats par expérimentateur pour mettre au point le modèle animal afin d'être reproductible dans nos expérimentations.

Nous allons tester 2 scaffolds différents provenant de la flore tropicale (Aloe Vera et Canne à sucre). Ceux-ci seront également enrichis avec des facteurs de croissance pour évaluer l'amélioration de la cicatrisation. Ce qui représente en tout 7 conditions, nous utiliserons 6 animaux par condition ce qui est un minimum pour atteindre une pertinence de l'outil statistique utilisé dans ce projet. Le projet utilisera donc un total de 48 rats Wistar.

La procédure la plus contraignante sera la procédure chirurgicale de section du tendon d'Achille et reconstruction. Les animaux recevront un traitement d'analgésique, la buprénorphine, pendant toute la durée de la chirurgie mais aussi toute la phase post opératoire (au moins 48h post opératoire). Leur état clinique et algique sera évalué tous les jours grâce à des grilles de scoring de la douleur. Par ailleurs, du fait de leur quadrupédie, les rats supportent mieux les lésions du tendon d'Achille car ils peuvent transférer le poids du corps sur les autres pattes non lésées.

**9219** Un des enjeux de la pharmacopée est de découvrir de nouvelles molécules ou des propriétés insoupçonnées de molécules connues, destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les produits naturels, de par leur incroyable diversité moléculaire, sont des outils pharmacologiques essentiels pour la recherche fondamentale et représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques. Il n'est donc pas étonnant qu'ils soient à l'origine de plus de 50% des



médicaments. Parmi ces produits naturels, les imines cycliques (toxines de micro-algues marines), les venins d'animaux (mollusques, scorpions, serpents, araignées...) et les toxines botuliques (toxines bactériennes) représentent une source originale et, pour certains d'entre eux émergente, de composés bioactifs potentiellement retrouvés dans les médicaments.

Ce projet vise à évaluer, in vivo, les mécanismes d'action de certains de ces composés bioactifs sur les propriétés d'excitabilité du système neuromusculaire des animaux, par des méthodes d'électrophysiologie et de détection de la sensibilité mécanique (test de von Frey) et thermique (test de la plaque chaude). Le système neuromusculaire, dans un modèle de rongeur sous anesthésie générale, est une cible pour étudier les effets et les mécanismes d'action de ces composés, mais aussi appréhender les risques potentiels sur les humains. En outre, en raison de leur spécificité d'action, certains de ces composés pourront servir d'outils pour concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans cette optique, des méthodes de détection de la sensibilité mécanique (test de von Frey) et thermique (test de la plaque chaude) seront ponctuellement effectuées sur un modèle vigile de rongeur.

Le recours à l'animal est ici indispensable car aucun modèle in vitro ou in silico ne peut aujourd'hui reproduire la complexité du comportement physiologique du système neuromusculaire des mammifères. Le rongeur, de par les similitudes fortes de son système neuromusculaire avec l'Homme, est un modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme.

Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 480 rongeurs spécialement élevés à cette fin et provenant d'élevages agréés par des autorités compétentes. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables. Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, permettront de garantir leurs conditions de vie. Leur état de santé sera surveillé tout au long du projet, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**9220** Le cancer de l'œsophage est une pathologie fréquente et grave. Il représente la 6ème cause de décès par cancer dans le monde.

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

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

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

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

Pour éviter toute souffrance, l'intervention aura lieu sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. On appliquera sur la cicatrice le gel seul, ou associé aux vésicules extracellulaires, afin d'être comparé à la DSM sans traitement complémentaire.

Les animaux seront ensuite suivis cliniquement pendant 4 semaines quotidiennement en association avec notre équipe vétérinaire. Nous évaluerons le comportement, l'alimentation, l'hydratation, les signes de souffrance. Une grille précise d'évaluation des points limites sera définie et des antalgiques adaptés à ces points limites seront utilisés. Une analyse radiologique et endoscopique sera réalisée à J14 et J28, également sous anesthésie générale et antalgiques, afin d'évaluer la sténose œsophagienne.

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

**9221** La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalée accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique. Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine. Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques anti-migraineuses (encore très insuffisantes de nos jours).

Le but de ce projet est de tester l'activité antimigraineuse d'un inhibiteur des enképhalines qui a montré son efficacité dans des modèles de douleurs neuropathiques. Il a, à la fois, une activité anti-hyperalgésique et une activité anti-allodynique chez le rat. Dans ce projet, nous évaluerons les effets de l'administration systémique répétée de ce composé sur l'allodynie mécanique céphalique, dans un modèle de migraine chez le rat, déclenchée par l'injection systémique répétée d'un donneur de NO (monoxyde d'azote), l'isosorbide dinitrate (ISDN). On sait maintenant que la puissante action vasodilatatrice des «donneur de NO», expliquent leur particulière propension à déclencher des céphalées chez les sujets sains et une crise de migraine chez les patients migraineux.

Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 15 à 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN (comme chez l'homme). Dans cette étude, 2 groupes de 10 rats seront utilisés : 1 groupe recevant en traitement préventif 100 mg/kg de l'inhibiteur d'enképhalines par voie orale (1 fois par jour pendant 5 jours et un groupe (témoin) qui recevra du sérum physiologique par la même voie et à la même fréquence. Les deux groupes seront soumis (10 minutes après l'administration orale) à 5 injections répétées d'ISDN (1 /j /5 jours) et les effets sur la sensibilité mécanique (mesure du seuil de retrait de la face lors d'une stimulation mécanique très légère) seront mesurés ensuite toutes les 1/2 heures sur une période 4h post ISDN.

Au total 20 animaux seront utilisés dans ce projet. Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Le nombre d'animaux par groupes et le nombre de groupes sont réduits au maximum tout en permettant une discrimination des effets antalgiques potentiels. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie, mettrait fin à l'expérimentation pour ces animaux par une euthanasie par injection létale

d'anesthésique. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique.

**9222** De récentes études épidémiologiques ont démontré que des interruptions isolées ou répétées du flux sanguin dans le rein représentent une cause importante d'insuffisance rénale, condition clinique associée à une haute mortalité chez l'homme. A l'hôpital, ces interruptions du flux sanguin sont appelées ischémies et leur reprise reperfusion ; le phénomène dans son ensemble est défini comme ischémie-reperfusion (IR) rénale.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour prévenir ou traiter la perte de fonction et les dommages rénaux induit par l'IR, phénomène inévitable au cours de la transplantation rénale.

L'objectif de ce projet est donc de mimer en trois phases l'IR au cours de la transplantation rénale :

- Une phase d'ischémie chaude correspondant à l'étape d'interruption chirurgicale du flux sanguin au niveau du rein avant le prélèvement chez le donneur.

- Une phase d'ischémie froide avec perfusion du rein avec un liquide de préservation froid, correspondant à la période de prélèvement chez le donneur, transport et conservation du greffon avant transplantation.

- Une dernière phase de reperfusion correspondant à la reprise du flux sanguin rénal et la remise en fonction de l'organe chez le receveur.

Ce modèle sera ensuite utilisé pour tester les candidats médicaments pouvant prévenir et/ou réduire de façon significative les dommages rénaux induits par l'IR.

Actuellement, aucun modèle in vitro ne peut mimer la transplantation rénale dans son ensemble et dans sa complexité. La seule méthode permettant une telle évaluation est la transplantation rénale chez l'animal qui implique l'utilisation d'un donneur et d'un receveur avec des problèmes immunitaires importants. Ici, nous mimerons dans le même animal les trois phases d'IR (ischémie chaude, perfusion froide et reperfusion) comme décrit ci-dessus. Ainsi, nous pourrions mesurer la fonction rénale sans recours à une euthanasie pour l'obtention de greffon et s'affranchir des problèmes de compatibilité immunologique tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

En accord avec la règle de raffinement, toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle par l'utilisation de tapis chauffant et réhydratation pré et post opératoire sera réalisée. Des prélèvements à différents temps nous permettront de mesurer des biomarqueurs d'intérêts pour cette pathologie et/ou d'en identifier de nouveaux pouvant prédire son évolution. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle des 3-R.

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet sera de 1500 rats sur 5 ans comme décrit au paragraphe 3.4.10, avec un minimum de 10 animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupes sera fonction du nombre de candidats médicaments et/ou de doses à tester. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement de l'hébergement approprié sera introduit auprès de ces derniers.

**9223** Le diabète est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Cela se traduit par un taux de glucose dans le sang (glycémie) élevé, le diagnostic est posé lorsque que cette glycémie est supérieure à 1,26 g/l. Le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant survient généralement chez des personnes jeunes (enfants, adolescents, jeunes adultes). C'est une maladie auto-immune dans laquelle les cellules bêta pancréatiques sont détruites par des anticorps et des cellules de l'immunité, les lymphocytes, fabriquées par l'organisme. Il résulte donc de la disparition des cellules bêta du pancréas entraînant une carence totale en insuline, cette hormone étant la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. Le corps ne fabriquant plus du tout d'insuline, l'unique traitement actuel est l'apport d'insuline, soit sous forme d'injections sous-cutanées avec une seringue ou un stylo, soit avec une pompe à insuline, appareil portable ou implantable destiné à administrer l'insuline en continu. Si on utilise l'insuline en injections chez les diabétiques, c'est parce qu'elle est détruite par les enzymes et l'acidité gastrique lorsqu'elle est administrée par voie orale. Le patient doit apprendre à se faire ses propres injections d'insuline à raison d'une à trois fois par jour. Ces injections quotidiennes, incontournables, sont contraignantes et de nombreuses

recherches pour trouver d'autres formulations de l'insuline ont donc été entreprises, mais jusqu'ici sans succès.

Des chimistes impliqués dans ce projet ont développé d'une part un nouvel hydrogel qui permet de protéger des molécules prises oralement de l'acidité gastrique, et d'autre part des cyclodextrines (CDs) qui pourraient protéger l'insuline des attaques enzymatiques. Les CDs sont des sucres assemblés pour former des nanovecteurs capables de délivrer des médicaments. L'enrobage de l'insuline par les CDs a été réalisé avec succès, ainsi que l'association avec l'hydrogel. Cette nouvelle formulation de l'insuline devrait pouvoir la protéger suffisamment pour lui permettre un passage dans la circulation sanguine après une prise orale.

Afin d'évaluer cette protection et de suivre l'éventuelle action hypoglycémisante de cette insuline, des tests *in vivo* chez l'animal sont nécessaires. La nouvelle formulation d'insuline sous forme de gel sera donnée à des rats, sains et diabétiques, par voie orale et nous suivrons son passage dans le sang et son efficacité par des dosages sanguins, réalisés toutes les heures, de la glycémie et de l'insulinémie pendant 10 heures. La prise orale d'insuline sera comparée à une injection classique par voie sous-cutanée.

Au total, 55 rats au maximum seront inclus dans ce protocole. Tout au long du protocole *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Les rats seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé et une habituation aux manipulations/prélèvements sanguins qui seront nécessaires lors du test d'efficacité sera réalisée pendant les 72h précédant. Un suivi tout particulier sera réalisé après l'induction du diabète, 24h d'eau sucrée après l'induction, puis humidification de la nourriture lorsque le diabète sera déclaré.

**9224** La glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP) à croissant est une maladie rénale très rare : 200 à 300 nouveaux cas par an en France. Elle est liée au dépôt d'anticorps dans les unités de filtration des reins, les glomérules. Ces dépôts activent localement la sécrétion d'un facteur de croissance, l'HB-EGF, qui stimule de façon excessive les cellules du glomérule, les podocytes. Ceux-ci prolifèrent, désorganisent la structure des glomérules et entraînent en quelques semaines ou mois la perte irréversible de la fonction rénale. Les traitements actuels sont basés sur une immunosuppression agressive par les corticoïdes et des agents anti-cancéreux ciblant le système immunitaire.

Les effets indésirables du traitement sont importants et la qualité de vie des patients très altérée. La mortalité à 5 ans est de 30% et 70% des survivants ont une insuffisance rénale terminale.

Nous avons développé une protéine thérapeutique, appelée DTR8, capable de neutraliser l'HB-EGF dont la sécrétion détruit les glomérules du rein. Les performances de cette molécule dans des tests cellulaires sont excellentes.

Cependant, la complexité de la maladie, notamment liée à l'articulation entre une cause immunitaire et un processus de prolifération de cellules très particulières requière une démonstration d'efficacité dans un organisme entier. La souris et le rat ne peuvent être utilisés car leur HB-EGF est trop différent de celui de l'Humain. Les risques non nuls liés à l'injection d'une protéine thérapeutique chez l'Homme implique un test préalable chez l'animal pour démontrer conjointement innocuité et efficacité. Il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Nous avons entrepris de tester chez le porc charcutier l'efficacité de la protéine DTR8 contre la glomérulonéphrite rapidement progressive. Le système immunitaire, les reins, la peau, le système circulatoire et cardiovasculaire des porcs sont très proches de ceux de l'Homme. L'HB-EGF du porc est identique à celui de l'Homme.

Le projet prévoit le recours à 70 porcs au maximum, spécialement élevés à cette fin et provenant d'élevages agréés par des autorités compétentes. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Vingt-deux animaux recevront des doses croissantes d'anticorps dirigés contre les glomérules rénaux. Le développement de la maladie sera suivi par la mesure de la filtration rénale et de l'épuration du sang par le rein. Des prises de sang régulières permettront de déterminer les doses

d'anticorps nécessaires pour induire une maladie semblable à celle de l'Homme. Ce modèle expérimental aidera au développement de nouveaux traitements et à un meilleur dépistage de la maladie chez l'Homme. Ensuite, 4 groupes de 12 animaux recevront la dose d'anticorps permettant d'induire la maladie. Trois à 4 jours après, 3 des groupes recevront un traitement quotidien pendant trois semaines : un groupe corticoïdes seuls, un groupe DTR8 seul et un groupe recevra la combinaison des deux traitements. Le dernier groupe recevra un traitement placebo comme contrôle. La fonction rénale des animaux sera suivie par des prélèvements sanguins et urinaires réguliers. La structure des glomérules sera étudiée par biopsie au 14ème et au 28ème jour et microscopie. L'analyse des résultats permettra d'évaluer l'efficacité de la protéine thérapeutique DTR8 pour traiter les GNRP, seule ou en association avec les corticoïdes. Ce projet ne va pas considérer l'association à du cyclophosphamide, couramment associé aux corticoïdes chez l'Homme pour des raisons pratiques (coût du projet, lourdeur de nombreux groupes parallèles, paucité des données pharmacocinétiques du cyclophosphamide chez le porc).

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

**9225** L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets thérapeutiques de candidats médicaments et leur absorption, distribution et métabolisme dans l'organisme après administration. Cette étude est conçue dans le cadre des pathologies urogénitales, rénales et gastro-intestinales déjà étudiées au sein de notre structure d'expérimentation in vivo. Les effets des candidats médicaments seront évalués sur des prélèvements de fluides biologiques chez l'animal (sang, urines et fèces). Les organes des animaux seront ensuite prélevés après euthanasie, ces prélèvements ne feront donc pas l'objet de cette demande d'autorisation de projet. Cependant, dans l'optique du respect de la règle des 3R, ces prélèvements tissulaires seront ultérieurement utilisés et étudiés afin de mieux comprendre et compléter les résultats qui auront été obtenus sur les analyses des fluides biologiques. Nous étudierons les effets sur la fonction rénale et vésicale en prélevant les urines, sur la fonction gastro-intestinale en prélevant des fèces et enfin sur la fonction rénale et/ou la pharmacocinétique (absorption, distribution et métabolisme) en prélevant du sang. Les effets thérapeutiques des candidats médicaments seront évalués par analyse des biomarqueurs, présents dans les fluides biologiques et dans les organes prélevés.

Actuellement, l'expérimentation in vitro ne permet pas ce type d'évaluation car elle ne reproduit pas le métabolisme observé dans l'organisme entier et ne permet pas d'étudier la pharmacocinétique ou la dégradation d'un candidat médicament, rendant le recours à l'expérimentation animale incontournable.

Pour ce projet, trois espèces (rat, souris ou cobaye) pourront être utilisées en fonction de la nature et du mécanisme d'action du candidat médicament et surtout de la pathologie ciblée.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 1 200 rats, 1 000 souris et 600 cobayes en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, différents types d'enrichissement seront rajoutés aux animaux et adaptés à l'espèce utilisée, tels que des nestlets (carrés de coton), aspen-brick (bâtons à ronger), igloos, tunnels ou huttes en polycarbonate.

Durant toute la période d'expérimentation, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite au traitement avec les candidats médicaments.

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait euthanasié. Certains prélèvements pourront être pratiqués sur animaux anesthésiés et placés sur tapis chauffant permettant de mettre en place un raffinement.

Dans ce projet, nous avons mis en place une stratégie pour réduire au maximum le stress des animaux et la quantité d'animaux utilisés tout en obtenant des résultats fiables pour la mesure de la

fonction rénale, vésicale et gastro-intestinale. En effet, l'utilisation de cages à métabolisme (technique non-invasive ; principe de raffinement) permettra de suivre la progression de la pathologie dans le temps via la mesure des marqueurs urinaires et fécaux sans besoin de recourir à l'euthanasie de l'animal aux différents temps du protocole expérimental (principe de réduction).

**9226** Le cancer du sein « triple négatif » (CSTN) est le sous-type le plus agressif des néoplasies mammaires. Ils comportent un plus grand risque de résistance au traitement et donc de stade métastatique. Le traitement standard actuel débute par une chimiothérapie néoadjuvante suivie de l'exérèse chirurgicale. L'hormonothérapie ne peut être utilisée en l'absence des récepteurs aux œstrogènes (RE). Cependant il a été démontré que l'utilisation de chimiothérapies, notamment ciblant la voie des MAP kinases, pouvaient entraîner une surexpression des RE, dans les tumeurs initialement RE +. Voir, dans un plus faible pourcentage, une expression dans les tumeurs initialement RE -/HER2+. L'identification de ce phénomène au sein des CSTN, traités par chimiothérapie conventionnelle, permettrait l'utilisation de l'hormonothérapie et pourrait limiter l'éventuel développement de mécanismes de résistance.

Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer, sur modèles précliniques, l'expression potentiellement induit par des produits de chimiothérapie ciblant la voie de MAPK, puis par d'autres produits de chimiothérapie classiquement utilisés dans le traitement du CSTN. Cette évaluation sera conjointement réalisée par une étude anatomopathologique de tumeur et par l'acquisition d'imagerie moléculaire ciblant les récepteurs aux œstrogènes. L'objectif de ce travail sera d'évaluer, sur modèles précliniques, l'expression des RE grâce à l'imagerie moléculaire et de la comparer à l'immunohistochimie. Notre choix, pour l'imagerie moléculaire, s'est porté sur le fluoroestradiol marqué au Fluor 18 (18F). La comparaison avec l'immunohistochimie permettra de mettre en corrélation l'expression des RE et la fixation de 18F-fluoroestradiol (18F-FES). Pour la caractérisation du modèle il sera réalisé une étude préliminaire sur un modèle de cancer du sein « triple positif » (MCF-7). Puis, l'étude d'une éventuelle réexpression des RE sur une lignée initialement triple négatif (MDA-MB-468) implantés en sous cutanée sur des souris de type NMRI-Nude (Foxn1 nu/ Foxn1nu) après injection d'une monothérapie.

Cette étude sera répartie en deux grandes parties :

(i) Etudes de faisabilités et de mise au point : caractérisation des modèles de xéno greffes des lignées MDA-MB-468 et MCF-7 concernant les récepteurs aux œstrogènes et détermination des paramètres d'imagerie du nouveau radiotraceur sur nos modèles : un total de 20 souris sera nécessaire.

(ii) Etude thérapeutique : évaluation de la réexpression des récepteurs aux œstrogènes suite à une pression thérapeutique par traitement au panitumumab. Cette évaluation se fera sur des modèles de xéno greffes de cancer du sein (MDA-MB-468). Pour cela un total de 38 souris sera nécessaire.

Dans le cadre de ce projet, un total de 58 souris femelles âgées de 4 semaines seront nécessaires. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre d'animaux est réduit au maximum en sélectionnant uniquement les expérimentations essentielles. La mise au point de nouvelles molécules d'imagerie en médecine nucléaire demande des études précliniques sur modèles animaux qui seront évaluées par des instances dédiées à l'évaluation scientifique lors de la publication des résultats dans des revues scientifiques. Des méthodes sont utilisées pour un souci du bien-être animal (condition d'hébergement optimisés, portoirs ventilés, enrichissement de milieux, surveillance quotidienne). De plus, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, Œil clos, diarrhée.). Toute observation d'un de ces points limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet. En cas de douleurs dues au développement tumoral, la souris sera placée en cage individuelle et un traitement anti inflammatoire (ibuprofène 3mg/kg) pourra être ajouté dans l'eau de boisson, sous réserve que celui-ci n'interagisse pas avec le traitement antitumoral. Cependant nous tenons à préciser que ce phénomène n'a jamais été observé par les différentes équipes ayant eu recours à ce type de modèle.

Au final, ce projet propose de démontrer la place de l'étude de l'expression des RE par imagerie moléculaire dans le suivi des cancers du sein pour l'optimisation thérapeutique.

**9227** L'insuffisance cardiaque (l'IC) est une maladie fréquente (environ 500 000 personnes en France) et elle reste de mauvais pronostic malgré les progrès réalisés ces dernières années. En effet, même si les thérapeutiques disponibles améliorent les symptômes et diminuent la morbidité, elles n'ont pas d'impact réel sur l'évolution inéluctable de la maladie vers l'aggravation. La dépression et le déclin cognitif sont des comorbidités fréquentes de l'IC et qui alourdissent le fardeau de la maladie à la fois pour les patients IC et leurs aidants. La compréhension des mécanismes à la base du dysfonctionnement cognitif de l'IC s'avère difficile étant donné le caractère multifactoriel de la maladie. Ainsi, le déclin cognitif est souvent attribué aux désordres hémodynamiques perturbant la perfusion cérébrale ou est imputé aux médicaments prescrits. Notre hypothèse est qu'il existe un axe cœur-cerveau utilisant des voies nerveuses encore mal connues dont l'origine se trouve dans le tissu cardiaque et qui projettent vers le système nerveux central. Pour comprendre comment le cœur peut directement influencer l'architecture et les fonctions cognitives cérébrales, nous disposons un modèle d'ischémie cardiaque induite chez la souris par la ligature d'une artère coronaire. Dans ce modèle, il existe des modifications de l'architecture du tissu cardiaque et des perturbations du fonctionnement des fibres nerveuses liant le cœur au cerveau ce qui le rend approprié pour l'étude de la communication entre ces deux organes et de la cinétique des anomalies cérébrales. De plus, nous avons un outil pharmacologique capable débloquent spécifiquement les fibres provenant du cœur et projetant vers le cerveau. Au maximum, 140 souris seront utilisées. Les animaux sont repartis en : 20 pour une première manip de test du protocole, les autres sont réparties en quatre cohortes comportant chacune deux groupes de 12 animaux (96). Pour faire face à la mortalité per- ou postopératoire probable, en particulier dans les groupes subissant une ischémie cardiaque. Nous aurions éventuellement besoin de 24 souris supplémentaires. Au total nous aurons besoin de 140 animaux.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera appliquée dans ce projet :

-L'expérience a été organisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en prenant en compte la mortalité post-chirurgicale.

-L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et à de potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global. Les expériences sont réalisées en utilisant un anesthésique couplé à un analgésique et les mesures de raffinement sont également respectées en contrôlant la température de l'animal grâce à un tapis chauffant et par suivi de l'animal par électrocardiogramme (intégré à notre système d'imagerie).

-Dans ce cas précis (étude physiologique), on ne pourra pas remplacer l'expérimentation sur les animaux, mais nous avons réduit le nombre de souris pour les réutiliser.

**9228** La douleur chronique est un état de ressenti douloureux persistant associé à un affect négatif et à du stress. Ses graves conséquences sur la vie des patients en font une pathologie à part entière. Le soulagement de cet état de douleur chronique constitue un des challenges importants du 21ème siècle ; pourtant les mécanismes à l'origine de la chronicisation de la douleur sont encore mal compris et les douleurs chroniques restent largement résistantes au traitement.

Notre équipe souhaiterait étudier le phénomène de sensibilisation centrale qui pourrait être à l'origine de la chronicisation de la douleur. Les changements de l'activité neuronale induits par la sensibilisation centrale constitueraient en effet, sous certaines conditions pathologiques, un générateur central de douleurs chroniques survenant sans lésion organique apparente. Ce mécanisme n'ayant été étudié à l'heure actuelle qu'au niveau spinal, il nous semble important d'explorer ce phénomène au niveau d'un des grands réseaux cérébraux impliqués dans la sensibilisation centrale nociceptive impliquant le cortex insulaire.

Cette étude sera réalisée grâce à des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires in-vivo chez le rat. Ce projet portant sur l'étude d'un système intégré et mature, il nous est impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests in-vitro.

Ce projet se déroulera sur 4 ans et nécessitera au total l'utilisation de 420 rats. En accord avec la règle des 3R, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux tout en assurant la fiabilité des résultats. Pour éviter toute souffrance, les animaux seront anesthésiés durant l'intégralité des expériences et les paramètres physiologiques maintenus dans des valeurs physiologiques. L'anesthésie profonde sera maintenue pendant toute la procédure qui se déroulera sans réveil.

La réalisation de ce projet devrait déboucher sur une meilleure compréhension des mécanismes de régulation endogènes de la douleur et de leur dysfonctionnement entraînant le développement des douleurs chroniques et permettre ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

**9229** La substance blanche du cerveau est une structure extrêmement dynamique chez l'adulte. La formation de la myéline ou son remodelage sont probablement à l'origine des modifications de la substance blanche, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents restent inexplorés. Comprendre la dynamique des cellules oligodendrogiales dans le cerveau normal et malade est la clef pour répondre à des questions sur la plasticité de la substance blanche, la myélinisation et réparation de la myéline. Dans ce projet, nous étudierons la dynamique de recrutement, de la prolifération et de la différenciation des cellules oligodendrogiales au niveau du corps calleux de la souris en conditions normales et pathologiques. Nous éluciderons les mécanismes dépendants de l'activité neuronale qui contrôlent l'oligodendrogénèse.

Nos expériences seront menées en induisant une lésion démyélinisante locale au niveau du corps calleux avec une chirurgie stéréotaxique et en utilisant plusieurs types de protocoles expérimentaux. Ces protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures *in vitro* car il s'agit de reproduire une démyélinisation locale dans l'environnement naturel des cellules et d'étudier leur dynamique. Un total de 1000 souris transgéniques sur cinq années sera utilisé pour des stimulations optogénétiques, des expériences d'imagerie biphotonique et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale (les trois R). Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Nous espérons être pionniers dans l'étude de la dynamique des cellules oligodendrogiales chez l'animal vivant dans une région jusqu'alors inaccessible, mais très importantes car elle est impliquée dans des maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaques et dans de nombreux troubles psychiatriques. Nous espérons que les résultats de ce projet ouvrent la voie pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies.

**9230** La progression d'un cancer est un phénomène complexe dépendant des propriétés des cellules cancéreuses mais également des cellules du microenvironnement tumoral comme les cellules du système immunitaire. Ces différentes cellules interagissent et ce dialogue conditionne leurs potentiels de prolifération. L'enzyme ELOVL5 retrouvée dans les cellules cancéreuses et des cellules immunitaires participe à définir la structure de la membrane cellulaire en lipides et donc à la fonctionnalité de la cellule.

ELOVL5 présente ainsi des potentialités dans la régulation du cancer par une action sur les cellules tumorales et immunitaires. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de ELOVL5 dans la progression tumorale.

Remplacement : Les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement conditionnent le devenir de la tumeur et impose par conséquent l'utilisation d'un modèle *in vivo* empêchant le remplacement du modèle souris par des modèles *in vitro*.

Réduction : Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons déterminé l'effectif nécessaire par groupe en s'appuyant sur notre expérience antérieure en prenant en compte la variabilité interindividuelle et à l'aide d'un outil statistique permettant d'obtenir un résultat fiable et analysable. De plus, l'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses murines sous la peau permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées.

Raffinement : Les souris soumises à cette procédure expérimentale seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. Les souris seront maintenues sans traitement antalgique pour ne pas interférer avec la réponse inflammatoire et éviter des modifications de



croissance tumorale. Elles seront surveillées quotidiennement et tout signe de douleur ou souffrance conduira à leur euthanasie. Au total, 280 souris seront utilisées.

**9231** La fibrose hépatique est la résultante commune aux maladies chroniques du foie (hépatite virale, alcoolique, auto-immune). Elle est caractérisée par l'accumulation anormalement élevée de constituants de la matrice extracellulaire "MEC" tel que les fibres de collagène dans les tissus hépatiques.

Chez l'homme, le dépôt excessif de "MEC" va conduire à une altération des fonctions hépatiques, au développement d'une cirrhose et aux stades avancés de la maladie à l'apparition de cancer du foie pour lequel le pronostic vital des patients est fortement dégradé. La fibrose hépatique est la conséquence d'une transformation des certaines cellules hépatiques en un type de cellules capables de produire en grande quantité de la MEC. La recherche tente d'élucider les mécanismes de la transformation cellulaire afin de proposer un traitement, mais à ce jour, Il n'existe pas de traitement spécifiquement anti-fibrosant reconnu.

Dans ce contexte, la société Genoscience-Pharma a développé une molécule qui peut présenter un nouvel intérêt dans le traitement de la fibrose hépatique. Cette molécule, appelée « dérivé Quinoline » a montré un effet anti-fibrosant dans un modèle murin de cancer du foie.

Afin de confirmer cet effet et d'en évaluer le potentiel thérapeutique, nous nous proposons d'évaluer à nouveau cette molécule dans un modèle murin plus spécifique de la fibrose hépatique : le modèle de tétrachlorure de carbone (CCL4) chez le rat.

Il n'existe pas de méthode alternative au développement de lésions hépatiques de fibrose ou de cirrhose impliquant l'ensemble des acteurs cellulaires et structurels. Il ne peut donc pas être réalisé sur culture cellulaire ou autre technique de laboratoire alternative. D'où l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle murin de CCl4 présente l'avantage d'avoir une physiopathologie structurelle similaire à celle observée chez l'homme.

La stratégie d'évaluation sera basée sur un modèle régressif de la fibrose. Le début de traitement ne se fera qu'après l'apparition de la fibrose. Pour cela un temps de modélisation optimal de début de traitement sera déterminé, correspondant à un taux de fibrose hépatique significativement augmenté mais qui n'a pas encore atteint un plateau maximal. Etant à une étape intermédiaire qui permet une évolution de la fibrose dans les deux sens (progression ou régression), il sera alors possible d'évaluer tous les effets potentiels du traitement : régression de la fibrose, stabilisation de la fibrose, ou ralentissement de la progression de la fibrose. Les effets de la molécule seront comparés à ceux observés dans un groupe Placebo.

Des études complémentaires au développement de la molécule, ont montré aucune toxicité significative chez le rat sain pour des doses administrées jusqu'à 30 mg/Kg/j sur 28 jours. Dans cette étude le traitement sera administré par gavages à une dose inférieure, fixé à 15mg/Kg/j. Cette dose est équivalente à celle utilisée dans l'évaluation précédente du modèle du cancer du foie et pour laquelle aucun signe de toxicité n'a été montré.

L'apparition de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal sera déterminée quotidiennement par l'élaboration d'un score clinique de l'animal. En cas de douleur une analgésie pourra être mise en place par l'injection de buprénorphine (0,1 mg/Kg/j) SC et métacam (2 mg/Kg/j) p.o. dans l'eau de boisson. En cas d'atteinte des points limites les animaux seront exclus de l'étude. Une non réponse à la procédure d'analgésie ou de procédure de soin entrainera l'euthanasie de l'animal. Cette étude nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques en vue d'améliorer la performance thérapeutique, chez l'humain. Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre de 52 rats maximum nécessaires à cette étude répartis en trois groupes : un groupe contrôle, deux groupes sous modélisation CCl4 traité soit par placebo, soit par le "dérivé Quinoline". Les différentes mesures et dosages réalisés au cours de cette expérimentation, permettrons d'approfondir les connaissances des mécanismes de cette molécule mais également d'évaluer son potentiel intérêt comme traitement thérapeutique chez l'homme.

**9232** Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes de mémoire liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. En étudiant le fonctionnement du cerveau lorsque celui-ci forme et manipule les souvenirs, l'objectif de notre travail est de caractériser et de comprendre les mécanismes neurobiologiques fondamentaux de la mémoire. Les résultats de notre étude pourront donc avoir des implications importantes dans le domaine de la santé quant à l'amélioration des diagnostics et le développement de traitements efficaces.

Comment le cerveau enregistre, intègre et stocke les informations qu'il perçoit de l'environnement sous la forme de traces mnésiques stables et persistantes reste un phénomène encore méconnu. Avec une organisation cérébrale relativement proche de celle de l'Homme, la souris est une espèce de choix pour l'étude de fonctions cognitives complexes telles que la mémoire. Pour cette espèce, l'olfaction est une modalité sensorielle prédominante pour appréhender l'environnement. Ainsi, l'établissement de comportements cruciaux pour la survie de l'individu (alimentation, reproduction, interactions sociales.), repose majoritairement sur l'apprentissage et la mémorisation d'informations de nature olfactive. Dans ce projet, nous proposons d'étudier la formation d'un type de mémoire olfactive : la mémoire sociale. Cette mémoire, largement mise en jeu en conditions naturelles, permet la reconnaissance entre individus mais aussi la transmission d'informations importantes entre ces individus, comme celle d'une nourriture saine. L'avantage majeur d'étudier en laboratoire ce type de mémoire est la possibilité d'utiliser des tâches comportementales « écologiques », faciles à mettre en œuvre et qui minimisent l'atteinte au bien-être des animaux utilisés.

Dans ce projet, nous validerons et utiliserons deux tâches comportementales à caractère social : 1) Un test de reconnaissance sociale et 2) un test de transmission sociale de préférence alimentaire. Après avoir entraîné les animaux dans ces tâches, nous procéderons à l'identification exhaustive des régions cérébrales qui sont impliquées dans la formation de ces traces mnésiques olfactives. Pour cela nous utiliserons de nouvelles techniques d'histologie qui permettent une analyse à l'échelle du cerveau entier.

Les expérimentations décrites dans ce projet, qui n'imposent que des contraintes légères sur les animaux, seront conduites dans le plus strict respect de la règle des 3R, par un personnel compétent :

- Remplacement :

La souris est un modèle de choix qui permet d'obtenir des informations sur le cerveau d'un point de vue anatomique et fonctionnel, en grande partie transposables à l'Homme. Ce projet vise à caractériser la formation des traces mnésiques olfactives à l'échelle du cerveau entier. Le cerveau doit donc être intact pour que les connections entre les différentes régions cérébrales soient préservées et que nous puissions étudier leurs activations coordonnées. De plus, nous étudions les circuits neuronaux chez le sujet en train d'apprendre : il nous faut donc travailler avec des animaux vivants et vigiles. Pour ces raisons, il nous est impossible de conduire cette étude in vitro sur des cultures de neurones dissociés. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées in silico.

- Réduction :

Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 470 souris sur 5 ans. Ce nombre correspond au minimum requis pour pouvoir tirer des conclusions solides basées sur des tests statistiques adéquats et rigoureux. De plus, il sera ajusté par nos études pilotes qui viseront à optimiser les paramètres de nos expériences (pour réduire la variabilité dans nos résultats) et à réduire davantage le nombre d'animaux utilisés pour l'étude finale. De plus, nous utiliserons des animaux identiques sur le plan génétique, de manière à limiter davantage la variabilité de nos résultats. Il faut noter que sur les 470 souris requises, 150 souris seront simplement présentées comme « partenaires » lors des interactions sociales, et ne subiront donc que des contraintes légères liées à l'expérimentation.

- Raffinement :

Chacune des procédures expérimentales sera :

- clairement définie dans des protocoles connus des membres de l'équipe
- associée à des points limites menant à des actions claires de la part des expérimentateurs
- effectuée par du personnel compétent et encadré

Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : hébergement par petits groupes sociaux (maximum 4 souris par cage) jusqu'à la veille des tests comportementaux, dans des cages enrichies d'éléments leur permettant de

construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton). Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement par les expérimentateurs selon des critères objectifs, à partir desquels des points limites précoces seront établis pour éviter de prolonger toute souffrance.

Chaque souris sera habituée à l'expérimentateur et à l'enceinte de test, pendant au moins 3 jours avant le début des tests, pour limiter le stress des manipulations à suivre. Lors des tâches comportementales impliquant des interactions sociales entre souris, le stress des animaux sera rigoureusement contrôlé en évitant toute forme d'agression entre les individus.

L'euthanasie des animaux en fin d'expérimentation sera nécessaire pour pouvoir prélever leurs cerveaux et étudier les tissus cérébraux. Cette procédure sera réalisée par des expérimentateurs compétents et soucieux du bien-être animal, sous anesthésie profonde avec le degré d'analgésie recommandé par les services vétérinaires.

**9233** Actuellement, on compte plus de 350 millions de personnes diagnostiquées pour un diabète de type 2 dans le monde. A cause de notre mode de vie (sédentarité, régime alimentaire riche en graisses et en sucre), les cas déclarés de cette maladie sont en forte augmentation : les épidémiologistes prévoient plus de 550 millions de cas recensés en 2030. Ainsi, soigner cette pathologie représente un enjeu de santé publique majeur. L'un des premiers symptômes de cette pathologie est une glycémie (concentration de glucose dans le sang) très élevée, qui engendre des conséquences délétères dans tout l'organisme. Il convient donc de réguler et stabiliser cette glycémie à un taux physiologique. Dans cette perspective, nous avons récemment démontré une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à ralentir la motricité de l'intestin, via le système nerveux qui lui est propre, pour limiter l'absorption du glucose et son passage dans la circulation sanguine mais également pour améliorer son utilisation par les muscles. Notre objectif actuel est donc d'identifier une ou plusieurs molécules, par des approches pharmacologiques ou nutritionnelles, capables de ralentir des contractions intestinales, sans effets délétères pour l'organisme. Avant de tester ces différents composés en recherche clinique, chez l'Homme, nous devons valider leurs effets chez l'animal. Ainsi, le recours à un modèle de souris rendues obèses/diabétiques suite à un régime hyper-lipidique prolongé, est indispensable pour nos recherches, modèle mimant parfaitement la pathologie chez l'Homme. Les effets observés dans les différentes procédures expérimentales devront être comparés à ceux observés chez des souris nourries avec un régime standardisé. Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 4000 souris en raison de 800 animaux par procédures (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester sur une durée de 5 ans. Cet effectif nous permettra de tester 20 conditions expérimentales distinctes (nature de la molécule, dose de traitement...). Un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements. Dans le cas, où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait euthanasié afin de ne pas engendrer de souffrance.

**9234** Ce projet de recherche fondamentale comportera l'utilisation de 64 animaux et aura une durée de deux ans, il vise à étudier la pathologie du virus Ebola chez le hamster doré. Ce virus a initialement été décrit en 1976, depuis cette date plusieurs épidémies ont eu lieu et notamment une en Afrique de l'Ouest, d'une ampleur inégalée. Il est responsable d'une fièvre hémorragique souvent fatale pour les primates (humains/non humains). Les données bibliographiques antérieures ont pu mettre en évidence de nombreuses similitudes entre le modèle hamster et la pathologie observée chez les primates. En effet seul l'étude dans un modèle in vivo permet d'appréhender la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'infection à virus Ebola. A ce jour nous souhaitons pleinement analyser, le virus adapté aux hamsters et notamment la version recombinante obtenue par génie génétique. Ainsi le modèle Ebola-Hamster, s'il démontre ses similitudes avec le modèle primate, pourra alors en partie remplacer celui-ci et ainsi limiter l'utilisation de primates non humains. Il est attendu que les animaux développent une forme sévère de fièvre hémorragique, il sera donc établi

des points finaux à l'expérience afin de limiter la souffrance. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons des groupes de 6 animaux soit 64 animaux au total ce qui permettra d'apporter une réponse qualitative et quantitative à nos questions. Un enrichissement spécifique de l'environnement (nourritures spécifiques, litières variées, jeux) sera réalisé afin d'augmenter le bien-être animal, enfin tous les actes seront réalisés sous anesthésie (y compris les prélèvements sanguins sous anesthésie gazeuse) afin de limiter au maximum toutes sources de stress ou de souffrance. Ainsi une attention toute particulière est menée afin d'appliquer les principes de la règle des "3R" (Réduire, Raffiner, Remplacer) dans ces procédures.

**9235** Les microsphères sont utilisées depuis plusieurs années pour l'embolisation et la libération de chimiothérapie dans de nombreuses localisations tumorales. Cependant, même si elles sont apportées sur le site tumoral par cathétérisme, il n'est pas possible de les voir à ce jour. Ce projet vise à démontrer la possibilité de suivre par imagerie multimodale des microsphères radio-opaques. Ceci permettra de visualiser directement la qualité de l'embolisation (complète/partielle) mais également des risques d'embolisation de tissu non souhaités (tissu sain) pour des notions de sécurité. Après avoir été préalablement sélectionnées parmi de nombreuses formulations possibles à partir d'études dans des gels in vitro pour leurs propriétés opacifiantes, les propriétés de viscosité ne peuvent être évaluées qu'en conditions in vivo. Le remplacement des animaux n'est donc pas possible. Toutefois, la réduction du nombre final d'animaux est suivie et le nombre d'animaux a été ramené ici à son strict minimum. Le projet sera donc réalisé chez une brebis par formulation (soit 4 brebis). Au cours des expériences in vitro, une dizaine de formulation sera évaluée, 4 seront retenues sur la base de leur propriété d'agent contrastant. Toutefois, seule l'expertise du chirurgien interventionnel pourra définitivement valider une formulation sur la base des propriétés d'injectabilité. Afin de se prémunir d'évènements indésirables majeurs, 2 brebis supplémentaires sont prévues mais ne seront pas utilisées théoriquement. Au total, 6 brebis sont donc incluses dans cette demande. Le choix de la brebis se justifie par le fait que le diamètre des artères est proche de l'homme. Le raffinement des expériences sera suivi afin de permettre le bien-être des animaux. Ils seront hébergés dans des box à 20°C avec accès à l'eau et nourriture ad libitum. Ils bénéficient d'une période d'acclimatation à leur environnement d'une semaine afin de réduire le stress. La procédure sera réalisée par du personnel formé et expérimenté. Les expériences seront faites sous anesthésie générale après sédation et toute approche sera faite doucement et calmement afin de ne pas les effrayer. Des protocoles d'anesthésie et analgésie complémentaire adéquate au type d'expériences sont prévus. Afin de diminuer l'angoisse pour les examens, les animaux seront tout d'abord prémédiqués par une injection intramusculaire de kétamine. En cours des expérimentations, un examen régulier des animaux et la surveillance constante des paramètres physiologiques permettra de dépister d'éventuels signes de souffrance. En cas d'apparition de signes de souffrance réfractaires aux analgésiques, une euthanasie sera pratiquée afin de ne pas augmenter douleur et souffrance animale.

**9236** Le remplacement des dents perdues par des implants est devenue une pratique courante dans les cliniques dentaires au cours des dernières décennies. L'intégration osseuse des implants dentaires est un processus complexe dans lequel la surface implantaire joue un rôle prépondérant. La plupart des implants dentaires présentent une surface rugueuse obtenue par sablage et par mordantage acide pour assurer un bon ancrage biomécanique dans le tissu osseux. Cependant, une contamination de la surface implantaire en titane est très souvent observée et diminue la biocompatibilité et l'osséointégration de ces implants. Une nouvelle méthode de sablage ultra propre des implants dentaires a été proposée comme alternative. L'objectif de cette expérimentation animale est d'évaluer la biocompatibilité et l'osséointégration d'implants dentaires possédant un état de surface innovant obtenu par sablage ultra propre par rapport à des implants classiques. Le modèle d'implantation dans l'os mandibulaire et maxillaire de mini-porcs est largement décrit dans la littérature. Cette évaluation préclinique est nécessaire pour l'obtention de l'autorisation réglementaire d'utilisation de ces nouveaux implants dentaires chez des patients.

En collaboration avec des chirurgiens-dentistes, et après l'approbation du comité d'éthique, 6 mini-porcs Yucatan seront opérés sous anesthésie générale. Les dents prémolaires et molaires seront extraites en bilatéral au niveau de la mandibule et du maxillaire des mini-porcs. Après 3 mois de cicatrisation, 10 implants dentaires (contrôles et tests) seront implantés sous anesthésie générale en bilatéral au niveau mandibulaire et maxillaire sur 6 animaux avec un temps de cicatrisation de 1 mois et 3 mois. Après euthanasie, la biocompatibilité et l'osséointégration des implants seront évalués par histologie.

Cette expérimentation animale sera réalisée en respectant le principe des 3R : remplacement : il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour évaluer l'intégration d'implants dentaires dans le tissu osseux ; réduction : un test de puissance statistique indique que pour démontrer une différence significative entre les 2 groupes d'implants, un nombre de n=10 par groupe est nécessaire, soit 10 implants par animal pour 2 groupes d'implants et 2 délais correspondant à 6 mini-porcs; raffinement : les chirurgies seront réalisées par des chirurgiens-dentistes expérimentés. Après l'intervention chirurgicale, les animaux seront hébergés dans des box individuels ajourés avec une litière en paille dans la même pièce, avec eau à volonté. La pièce où ces animaux resteront en convalescence tout au long de l'expérimentation est chauffée et climatisée. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers pour la prise alimentaire, le comportement et de l'état général. Sans réponse physiologique satisfaisante, il sera procédé à l'euthanasie par surdosage de barbiturique suivie du prélèvement du site lésionnel pour transmission aux scientifiques.

**9237** Cette manipulation s'inscrit dans la démarche de sensibilisation aux bonnes pratiques dans la mise en place d'une expérimentation animale en considérant les paramètres environnementaux et tout facteur pouvant être une source de stress ayant pour conséquence des modifications physiologiques non négligeables.

Ce protocole sera appliqué dans le parcours de 3ème année de licence en biologie dont une bonne partie des étudiants s'orientera vers des Masters et aura recours à l'expérimentation animale.

L'objectif principal est de mettre en évidence les conséquences d'un stress ayant pour origine des modifications environnementales et se manifestant notamment par l'augmentation de la pression artérielle qui sera le paramètre mesuré.

Afin de réduire le nombre d'animaux, les résultats des expérimentations seront regroupés et les situations stressantes seront :

-Soit une injection intrapéritonéale d'une petite quantité de sérum physiologique stérile considérée comme un agent « stresser » à la fois psychologique de par la contention manuelle, et physique de par la réalisation de l'injection. Cette manipulation est courante dans les protocoles expérimentaux.

-Soit une exposition pendant un temps court à un agent stresser chimique de type déodorant, vernis à ongle ou autres odeurs dont les animaux peuvent être en contact au travers des expérimentateurs ou personnels soigneurs.

-Soit une exposition pendant un temps court à un agent stresser physique par l'application d'une lumière stroboscopique, ou bruits variés que peuvent subir les animaux en salle de manipulation.

La pression artérielle sera mesurée par une méthode non invasive dans une boîte de contention permettant l'immobilisation de l'animal nécessaire à la prise de la tension artérielle et sera effectuée grâce à un manchon gonflable placé sur la queue (équivalent du sphygmomanomètre ou brassard gonflable avec manomètre utilisé chez l'Homme).

Cette contention est elle-même source de stress pour les animaux. Afin de diminuer l'angoisse générée par cette immobilisation, les animaux suivront une période d'habituation quotidienne d'une semaine, en associant la manipulation à une récompense afin d'établir le renforcement positif face au stress et non une sensibilisation. Cette période d'entraînement sera réalisée par les étudiants eux-mêmes afin de familiariser les animaux à d'autres personnes que l'animalier et supervisée par un manipulateur averti.

Si l'animal présente des comportements et signes suivants : agitation démesurée, agressivité, une diminution de la ventilation, l'animal sera remis en cage et ne sera plus manipulé.

Un nombre total de 100 souris sur 5 ans sera étudié. Elles seront stabulées en groupe dans une cage enrichie.

Une fois la procédure terminée, les animaux seront soit gardés en vie pour une autre procédure ou dans le cas contraire euthanasiés.

**9238** En recherche il est souvent important de connaître la numération sanguine (nombres de globules rouges, blancs, plaquettes, etc.) comme il est couramment fait chez l'homme. Le Micros 60 est un automate d'hématologie destiné à les compter. Or, cet automate est prévu pour doser exclusivement du sang humain. Cependant, il est utilisé par la communauté scientifique pour du sang de souris. Les cellules de différentes espèces n'ont absolument pas la même taille, de ce fait, lorsque l'automate compte les cellules de souris, les valeurs sont données à titre indicatif, elles ne peuvent être utilisées que pour des comparaisons de groupes ou à la suite des irradiations (suppression de tous les globules blancs).

Il devient donc important de valider les résultats fournis par le Micros 60 afin que les chercheurs puissent les utiliser comme des résultats à part entière.

En collaboration avec un plateau technique académique, nous allons doser les mêmes échantillons sur leur automate d'hématologie vétérinaire (spécialisé pour la souris) : l'IDEXX ProCyte DX1 et sur le Micros 60 dans le but de valider nos résultats.

Après l'analyse des données si elles sont comparables les résultats fournis par le Micros 60 seront alors considérés comme des valeurs absolues et utilisables par la communauté scientifique afin d'être intégrés dans les publications, sinon il faudra envisager le changement du Micros 60 au profit d'un automate vétérinaire.

Pour ce faire, il faut utiliser des animaux ayant de fortes variations de leurs paramètres sanguins. Dans les articles scientifiques, les plus importantes sont obtenues à la suite d'une prise d'alcool. Les souris seront alcoolisées par leur eau de boisson. Leur sang sera prélevé et analysé tous les 15 jours lors des phases d'alcoolisation et une fois, avant et après. De plus, la composition corporelle des souris sera mesurée toutes les deux semaines afin de déterminer la part de masse grasseuse, de masse maigre et d'eau de chacune des souris pour suivre leur évolution.

Nous utiliserons des souris car c'est l'espèce la plus utilisée dans les projets scientifiques de la communauté utilisant le Micros 60. Pour ce projet, 32 animaux répartis en 4 groupes (un groupe contrôle et trois groupes de souris qui boiront de l'alcool à trois concentrations différentes) seront nécessaires. Nous ne pouvons pas utiliser moins d'animaux car ce nombre est indispensable pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement utilisables.

Les animaux seront hébergés dans un service de zootechnie ayant obtenu l'agrément du Ministère. Ils seront suivis de façon journalière (week-end et jours fériés inclus) par des techniciens compétents et possédant de l'expérience. Une procédure mise en place dans ce projet implique une douleur très légère (lors de la prise de sang).

Une feuille de score va être mise en place pour suivre les animaux de façon individuelle. Si un score supérieur à 15 est atteint, les animaux seront euthanasiés (perte de poids maximum de 20 % par rapport aux animaux contrôle, poils hérissés, prostration, dos voûté, etc.).

**9239** En situation normale, la population est exposée, via l'environnement et l'alimentation notamment, à des mélanges complexes de polluants chimiques à faible concentration. Cette complexité peut être augmentée en situation d'accident nucléaire par la présence de radionucléides dans ces milieux. A l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles sur les effets biologiques et sanitaires de l'exposition combinée à une irradiation externe et à une contamination interne ou sur une exposition combinée à des polluants chimiques et des radionucléides. Rien ne démontre si ces expositions peuvent entraîner une additivité des effets, une synergie ou un antagonisme des effets liés à chacune des substances. Le système de radioprotection en vigueur repose sur une hypothèse d'additivité des effets engendrés par différentes expositions radiologiques, qu'elles soient internes ou externes.

Ce projet est la suite directe d'un précédent projet qui testait cette hypothèse par l'étude de la combinaison d'une irradiation externe avec une contamination interne par un seul radionucléide. Les résultats, encore très préliminaires, suggèrent que la biocinétique du radionucléide testé est légèrement modifiée par une irradiation externe à moyenne ou forte dose.

Ce projet a pour objectif de déterminer si de tels changements de biocinétique des radionucléides peuvent également apparaître en cas d'exposition combinée à ces deux radionucléides et en absence

d'irradiation externe. Le modèle expérimental choisi reste identique au précédent projet. Les deux radionucléides seront administrés à des souris soit seuls soit en combinaison. La mesure corporelle totale des radionucléides sera réalisée dans un nouvel appareillage de mesure de la contamination interne adapté à la taille des rongeurs de laboratoire également mis en œuvre dans le précédent projet.

Pour ce projet complémentaire, nous prévoyons d'utiliser 24 souris mâles Balb/C.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement, les conditions suivantes seront respectées :

Les animaux seront observés quotidiennement par les expérimentateurs ou par le personnel qualifié, avec un score basé sur le comportement, le suivi pondéral et le suivi de la température corporelle.

Tous les animaux seront hébergés en groupe selon les standards en vigueur.

Le nombre d'animaux utilisé est le nombre nécessaire et suffisant requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre les objectifs scientifiques du projet.

Ce projet nécessite par ailleurs une étude des effets à l'échelle de l'organisme dans son ensemble, les études in vitro de remplacement ne sont donc pas adaptées. Les effets biologiques attendus (sur la base des expériences réalisées précédemment) suggèrent qu'aucune souffrance ou douleur particulière n'est attendue dans ce projet.

**9240** L'apport de magnésium (Mg) est sous-optimal pour une grande partie de la population dans les pays occidentaux ce qui favorise un risque accru de carence latente en cet élément. Comme le suggèrent de nombreuses études d'association, ce déficit peut être à l'origine d'un large éventail de dysfonctionnements et progressivement d'une détérioration de la santé. De plus, divers états physiopathologiques peuvent contribuer à un déficit sub-clinique ou même sévère en Mg. Les manifestations cliniques, selon la gravité et la chronicité de la carence, comprennent une grande variété de symptômes, tels que symptômes neuro-musculaires (hyperexcitabilité, tétanie, crampes, fasciculations, tremblements, spasmes, faiblesse), fatigue, anorexie, apathie, altérations du comportement, tachycardie. Par rapport à une carence sévère, le diagnostic d'une carence latente et chronique est difficile en raison de symptômes cliniques non-spécifiques et d'une magnésémie souvent faiblement affectée. Environ 25% du Mg de l'organisme est situé dans le muscle squelettique. Même si l'importance du Mg dans la physiologie musculaire est bien documentée, le rôle spécifique des transporteurs Mg<sup>2+</sup> dans l'homéostasie du Mg dans le muscle, à notre connaissance, n'a pas été étudié. En fait, de façon générale l'identification de nombreux gènes jouant un rôle dans l'homéostasie du Mg est relativement récente.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'expression de plusieurs transporteurs du Mg<sup>2+</sup> dans le muscle squelettique et dans les leucocytes sanguins en réponse à l'abaissement du statut en cet élément. Le déficit en Mg sera obtenu par la réduction d'apport en cet élément dans le régime alimentaire des souris. Les résultats obtenus permettront une meilleure connaissance de la régulation du métabolisme du Mg dans le muscle et peuvent présenter un intérêt pour identifier certains transporteurs du Mg en tant que marqueurs potentiels du statut en Mg. En fait, le niveau d'expression de ces transporteurs pourrait mieux refléter le contenu et les besoins intracellulaires en cet élément que les dosages directs de cet élément. Le modèle utilisé sera la souris C57BL6/6J saine nourrie avec des régimes ayant des teneurs variables en Mg. Après une semaine d'adaptation au régime control (0.1% Mg), les animaux recevront, pendant les 2 semaines suivantes, soit un régime normal (0.1% Mg), soit un des 2 régimes pauvres en magnésium (0.01% et 0.003%). Nos précédents travaux réalisés sur cette souche de souris montrent que les teneurs en Mg plasmatique, érythrocytaire et osseux sont significativement réduites chez les animaux recevant le régime pauvre en Mg. Cependant, compte tenu de la courte durée de consommation des régimes pauvres en Mg (2 semaines) les manifestations cliniques de carence en Mg (amaigrissement, tétanie) n'ont pas été observées. Les animaux seront pesés hebdomadairement. A la fin de la période expérimentale, des prélèvements sanguins seront réalisés ainsi que des prélèvements du muscle gastrocnémien. Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle ; il est ainsi nécessaire d'utiliser 20 animaux par groupe pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Un nombre maximal de 60 souris sera utilisé pour ces travaux de recherche.

Cette étude répond entièrement à la règle des 3R. Remplacement : ce projet fera également appel à des approches en culture cellulaire pour répondre aux hypothèses mécanistiques. Toutefois l'étude in vitro ne permet pas de reproduire la complexité des réponses physiologiques et moléculaires à l'échelle d'un tissu et de l'organisme. Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux nécessaire à des analyses statistiques correctes. Raffinement : les souris sont placées dans les conditions optimales d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum, hébergés collectivement et bénéficient d'un environnement enrichi. Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

**9241** La genèse de nouveaux neurones, ou neurogenèse, est un processus observé durant la vie embryonnaire et chez l'adulte chez les mammifères. Ce processus repose sur l'existence de cellules souches neurales localisées dans un microenvironnement appelé niche. Cette niche fournit les signaux nécessaires au maintien et à la régulation de la prolifération et de la différenciation de ces cellules.

L'un d'entre eux est une protéine appelée Hedgehog présente très précocement au cours de l'embryogenèse mais aussi dans le cerveau adulte. Cette protéine active une voie de signalisation qui met en jeu des récepteurs membranaires appelés Patched et Smoothed. La modulation de cette voie de signalisation dans les niches de neurogenèse dans le cerveau adulte pourrait permettre de modifier les états de prolifération et de différenciation de ces cellules souches. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de ces étapes ne sont pas connus.

Notre projet est donc d'identifier et de caractériser le rôle de cette voie de signalisation Hedgehog et notamment des récepteurs Patched et Smoothed dans le contrôle de ces cellules souches dans le cerveau adulte. La mutation conditionnelle du gène Patched dans une lignée de souris permet l'inactivation spécifique de ce gène par la recombinase cre dans un type de cellules bien défini. Cette approche sera effectuée chez la souris, qui est l'espèce de mammifère pour laquelle l'approche génétique et les connaissances sur la neurogenèse adulte sont les plus avancées.

La compréhension des mécanismes cellulaires qui contrôlent la neurogenèse adulte pourrait permettre à l'avenir de comprendre le développement de tumeurs cérébrales et d'élaborer de nouvelles pistes pour le traitement de maladies telles que les maladies neurodégénératives ou encore la sclérose en plaque.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées est indispensable afin de comprendre ces différents mécanismes et de permettre l'élaboration de nouvelles pistes pour ces traitements.

L'utilisation de cultures de lignées cellulaires ou de progéniteurs neurales exclut l'étude des facteurs présents in vivo dans les différentes niches de neurogenèse. Il est donc primordial d'étudier les cellules souches dans leur environnement naturel.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de lignée de souris non-génétiquement modifiée, ni d'approche expérimentale (pharmacologique) permettant une telle étude.

L'essentiel de cette étude sera mené sur des cerveaux de souris génétiquement modifiées prélevés post-mortem, fixés d'un point de vue anatomique (n=100).

Néanmoins, le recours à l'expérimentation reste indispensable pour évaluer globalement l'effet de cette mutation sur la neurogenèse adulte. L'administration par voie intrapéritonéale de molécules de synthèse visant à moduler cette voie de signalisation sera réalisée. Pour chacune des 2 molécules étudiées, dix souris génétiquement modifiées seront utilisées pour établir des résultats de façon statistiquement significative (soit un total de 80 souris).

Ce sera donc un total de 180 animaux qui seront utilisés.

Les animaux seront hébergés dans des cages équipées de papier (sizzle-nest) destiné à réaliser un nid optimal pour la souris, et des abris en carton (smart home) à usage unique garantissant un enrichissement et l'observation optimale des souris.

En cas de perte de poids rapide observable (15-20%) ou si une modification de l'aspect physique (poils ébouriffés, grosseur abdominale ...) ou une atteinte du système nerveux central (tremblements, inclinaisons de la tête, hyperactivité), une feuille d'observation de l'état de l'animal sera établie. Les



procédures d'euthanasie de l'animal seront suivies en cas d'aggravation des symptômes. En cas d'amélioration, un suivi de l'animal sera réalisé jusqu'à la disparition des symptômes.

Pour réduire le nombre d'animaux, des lots de 5 à 10 animaux issus des mêmes portées seront traités en parallèle et serviront pour le tri cellulaire ou les immunohistochimie en optimisant les répartitions de coupes par lames.

**9242** Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Celles-ci sont caractérisées par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif. Dans la maladie de Crohn, cette inflammation peut être localisée à tous les niveaux du système digestif, même si c'est l'intestin qui est le plus fréquemment atteint alors que dans la rectocolite hémorragique, elle est localisée au niveau du rectum et du côlon. Ces maladies évoluent par poussées inflammatoires qui s'alternent avec des phases de rémission. Les MICI peuvent survenir à tout âge et 15% des cas concernent des enfants. Si leur fréquence varie considérablement d'un pays à l'autre, les taux les plus importants sont retrouvés dans les pays industrialisés, notamment en Europe du Nord-Ouest et aux Etats-Unis. Il n'existe pas de traitement curatif des MICI et la prise en charge mise en place pour soulager les patients consiste à contrôler l'inflammation pour induire une rémission clinique à l'aide d'un traitement pharmacologique (anti-inflammatoire). Malgré ces traitements, la plupart des sujets atteints de MICI devront subir une intervention chirurgicale. Cependant, la chirurgie n'est pas curative et les patients auront toujours besoin d'un traitement continu. Environ 70% des patients répondent bien à ces stratégies thérapeutiques. Toutefois, chez la moitié d'entre eux, l'efficacité de ces médicaments diminue au bout de deux ans, nécessitant de changer de molécule.

Plusieurs facteurs de risques sont associés aux MICI, notamment des facteurs génétiques et environnementaux. La présence d'une dysbiose intestinale ainsi que le dérèglement de la réponse immunitaire seraient également impliqués dans leur initiation et leur progression. En effet, la réponse immunitaire pro-inflammatoire augmente chez les sujets atteints de MICI et au niveau du tube digestif, la présence du microbiote semble amplifier le phénomène et induire de fortes inflammations locales. L'utilisation de sulfasalazine (sulfamide antimicrobien) permet chez certains sujets d'augmenter les phases de remissions, appuyant ainsi l'hypothèse que le microbiote intestinal joue un rôle dans ces pathologies.

L'objectif du projet sera d'étudier si l'administration préventive de la souche MRx0001 est capable de protéger le colon en atténuant l'inflammation digestive et d'identifier les mécanismes (microbien et/ou réponse de l'hôte) potentiellement impliqués. Grâce à son interaction avec l'écosystème colique mais aussi à la production de certains métabolites, la souche probiotique pourrait agir sur le microbiote et la réponse inflammatoire de la muqueuse colique et ainsi prévenir les inflammations digestives. Nous nous intéresserons ainsi plus particulièrement à l'impact du probiotique sur la composition du microbiote, son activité fermentaire mais aussi la physiologie colique (réponse immunitaire et inflammatoire). Des rats de souche Sprague Dawley conventionnels, 198 au total, seront utilisés. Après 14 jours de traitement préventif avec la souche probiotique ou ses métabolites, l'inflammation sera induite via l'administration de Dextran sulfate de sodium (DSS) via l'eau de boisson (4% DSS dans l'eau de boisson). Pour le respect de la règle des 3Rs, le nombre de chaque groupe d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements. L'étude de la modulation du microbiote intestinal via l'utilisation de probiotique dans le but de prévenir et/ou réduire les phénomènes d'inflammation intestinale ne peut être évaluée que sur un organisme vivant pris dans sa globalité. Les expériences proposées induisent un niveau de stress léger et de douleur modérée. Ainsi, tout au long de l'expérimentation une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire et chaque expérience sera exploitée au maximum pour réduire le nombre d'animaux utilisés.

**9243** L'objet de cette étude est de vérifier la tolérance d'un équipement médical, porté pendant 48h et destiné à la Mesure de la pression intraoculaire (IOP) à intervalle de temps régulier. Une IOP excessive présente un risque majeur de provoquer un glaucome. Le glaucome affecte 67 millions de personnes dans le monde. Cette pathologie représente la seconde cause de cécité après

le diabète dans les pays industrialisés. Cette pathologie affecte plus de 1% de la population de plus de 40 ans.

Plusieurs articles rapportent que l'IOP varie sur un cycle de 24 heures. Aujourd'hui, les ophtalmologistes effectuent une mesure d'IOP ponctuellement avec un tonomètre. Il n'y a aucune information sur la variation de cette pression avec le temps, en conséquence le diagnostic est potentiellement influencé, ou le traitement n'est pas approprié ou n'est pas correctement contrôlé. D'où l'intérêt d'un équipement tel que celui prévu dans cette étude.

L'équipement présent est constitué d'une lentille de contact équipée d'un capteur, d'un générateur de signal et d'un enregistreur. Les communications entre les éléments de l'équipement se font par des liaisons sans fils. La lentille de contact ainsi réalisée est à usage humain. Elle constitue la partie sensible de cet équipement et nécessite des tests précliniques obligatoires de validation avant de pouvoir réaliser des essais cliniques. Traditionnellement, l'œil de lapin est utilisé pour évaluer les propriétés irritantes des matériaux qui entrent en contact avec le tissu oculaire (Norme NF EN ISO 9334 « Lentilles de contact ... Détermination de la biocompatibilité par évaluation de la tolérance oculaire chez le lapin »).

D'où ce projet qui a pour but d'évaluer la tolérance de la lentille de contact de ce nouvel équipement novateur pour l'ophtalmologie.

La mise sur le marché d'un nouveau dispositif médical même non invasif oblige à mener une étude préclinique sur au moins une espèce animale, avant de lancer la phase d'étude clinique. Les yeux du lapin sont proches morphologiquement de l'œil humain, ce qui en fait un modèle de choix.

Le remplacement de toute utilisation d'animaux n'est pas possible, il n'y a pas d'autre alternative non-animale pour tester ce dispositif. Le dispositif prévoit de mesurer la pression intraoculaire, un modèle in-vitro est donc inenvisageable dans ce cas.

Concernant le raffinement des conditions de travail chez ces lapins, les procédures envisagées sont non invasives, et seront assurées par du personnel formé et expérimenté. Les lapins seront surveillés quotidiennement et des enregistrements sont prévus pour le suivi du confort des animaux. A la fin de ces procédures, le reconditionnement de ces animaux est prévu. Néanmoins, le nombre d'animaux finaux est établi afin de réduire au maximum le nombre total d'animaux à utiliser, suffisant de 10 lapins pour tout le projet, plus les 6 lapins supplémentaires à utiliser pour l'avenant de ce projet.

**9244** Les troubles de la fertilité humaine sont en constante augmentation. Environ 20% des couples consultent pour des difficultés à procréer. Les causes d'infertilité sont encore très peu connues. Le but de nos travaux est d'identifier les gènes impliqués et de comprendre comment ils fonctionnent.

Notre étude traite plusieurs questions liées à la fertilité :

- Comment se fait la transformation des cellules germinales rondes en spermatozoïdes matures, mobiles et féconds?
- Comment le spermatozoïde reconnaît et féconde l'ovule?
- Comment améliorer les conditions de culture de l'ovule et de l'embryon pour augmenter l'efficacité de la fécondation in vitro?

Au total, 85 souris seront utilisées au maximum.

Dix modèles de souris transgéniques seront générés pour répondre à ces questions. La fertilité des souris mâles sera testée «in vivo» par mise en accouplement avec des femelles et «in vitro» par mise en présence des spermatozoïdes issus de ces mâles avec les ovules de femelles préalablement super ovulées. Chez la souris comme dans l'espèce humaine, les femelles ne produisent à chaque cycle que quelques ovules. L'injection d'hormones permet une super ovulation assurant la maturation de 3 à 4 fois plus d'ovules qu'en cycle spontané. De nombreuses femelles sont néanmoins nécessaires pour obtenir des ovules en grand nombre pour les analyses in vitro, en particulier. Après fécondation, un lot de femelles sera suivi en imagerie pendant leur gestation pour analyser l'implantation et le développement des embryons. Pour suivre le développement des spermatozoïdes « in vivo », des souris mâles (50 maximum pour l'étude de l'ensemble de nos modèles) recevront une injection de BrdU, un produit n'entraînant pas de phénotype dommageable qui permet d'étudier la prolifération des cellules.

L'ensemble des animaux injectés (avec hormones ou BrdU) sera euthanasié pour prélèvement d'organes dans un délai de 2 à 60 heures après l'injection.

Ce projet sera réalisé chez la souris, modèle animal dans lequel la majorité des gènes, notamment ceux impliqués dans la fertilité, sont similaires à ceux de l'Homme.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. A chaque fois que cela sera possible, des modèles cellulaires in vitro seront développés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce sera le cas, pour certaines études de biologie moléculaire et cellulaire. Cependant il n'est pas possible de contourner le recours au modèle animal car la production de spermatozoïdes et d'ovules ne peut pas être réalisée in vitro.

Afin de limiter le nombre de souris produites pour nos analyses, les mêmes souris seront utilisées dans un premier temps pour les croisements (in vivo), ceci permettant d'évaluer la fertilité générale, puis, après euthanasie, leurs ovules et spermatozoïdes feront l'objet d'analyses in vitro.

Par ailleurs, nous aurons recours à l'imagerie afin de réaliser des échographies non invasives, réalisées sous anesthésie générale, pour suivre la gestation afin, là encore, de réduire le nombre de souris utilisées.

Au sein de l'animalerie, zootechniciens et personnels d'équipe de recherche veilleront quotidiennement au bien-être des animaux et contrôleront leur état de santé. Les animaux disposeront de cotons et d'abris adaptés, pour enrichir leur environnement.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse éventuellement infligées, la procédure d'échographie sera réalisée sous anesthésie générale ; l'administration d'antalgiques est prévue, dans le cas où un signe de souffrance de l'animal serait détecté lors de toutes les procédures.

A terme, les résultats de nos travaux devraient permettre de mieux comprendre les causes de l'infertilité et d'améliorer la prise en charge des couples ayant recours à l'assistance médicale à la procréation.

**9245** Les virus Influenza aviaires hautement pathogènes provoquent une mortalité très élevée chez les Galliformes (poulets par exemple), alors que la majorité des infections par les virus Influenza aviaires hautement pathogènes restent asymptomatiques chez les Palmipèdes (canards par exemple). Les virus Influenza aviaires hautement pathogènes dérivent de virus Influenza aviaires faiblement pathogènes qui ont acquis des mutations dans leur génome. Le but de ce projet est d'étudier comment le pouvoir pathogène et la transmission des virus Influenza aviaires hautement pathogènes et des virus Influenza aviaires faiblement pathogènes peuvent évoluer en fonction des souches virales et des traitements médicamenteux donnés aux animaux. L'espèce hôte étudiée dans ce projet est le canard mallard (*Anas platyrhynchos*). Nous étudierons six souches représentatives des virus Influenza aviaires ayant circulé ou en circulation en Europe. Nous utiliserons au total jusqu'à 1260 canards.

Les animaux seront suivis quotidiennement (examen clinique par le vétérinaire responsable de l'essai). Des prélèvements seront effectués sur les oiseaux vivants (écouvillons trachéaux et cloacaux) et des prélèvements d'organes sur les animaux euthanasiés. Hormis les signes cliniques liés à l'infection par les virus Influenza, nous n'attendons pas d'effets secondaires dus aux traitements médicamenteux administrés aux animaux, ceux-ci étant soit utilisés en médecine vétérinaire dans les élevages ou dans des essais cliniques décrits dans la littérature scientifique. Les conséquences de l'infection seront évaluées quotidiennement par le vétérinaire responsable de l'étude et elles seront comparées aux points limites définis dans le protocole de cette étude.

Ce protocole respecte les principes de remplacement (a), réduction (b) et raffinement (c) exposés ci-dessous :

a) L'utilisation d'animaux est nécessaire car les méthodes alternatives telles que la culture cellulaire ou les cultures d'organoïdes ne permettent pas d'évaluer le pouvoir pathogène qui ne s'exprime qu'à l'échelle de l'organisme entier et où la transmission virale inter-individus qui ne peut être évaluée qu'entre des individus vivants.

b) La validation des capacités répliquatives des virus in vitro et leur séquençage après amplification in vitro permet de limiter le nombre d'animaux utilisés au minimum pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique selon les paramètres mesurés. Le nombre d'animaux nécessaire est déterminé grâce à des études précédentes réalisées au laboratoire dans des espèces animales identiques et avec des virus similaires.

c) Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010/63 UE ; enrichissement de l'environnement par un point d'eau adapté aux canards.
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien des animaux) sans restriction;
- Habituation des animaux par une période d'acclimatation d'au moins cinq jours avant le début de l'expérience et manipulation des animaux par du personnel qualifié et expérimenté.
- Mise en place d'un suivi clinique quotidien par le vétérinaire responsable de l'essai et de points limites prédéfinis.

**9246** L'activité du cerveau est caractérisée par la présence d'activités rythmiques. Chez l'homme et chez l'animal cette activité rythmique cérébrale peut être mise en évidence par l'enregistrement de l'électroencéphalogramme. On peut alors montrer que cette activité rythmique varie selon le cycle veille-sommeil et selon l'activité dans laquelle sont engagés les individus. Ainsi, le sommeil est caractérisé par la présence de plusieurs rythmes : une activité oscillatoire très lente (fréquence inférieure à 1 Hz), par une activité " delta " (1-4 Hz) et par des " fuseaux " correspondants à des oscillations à 11-15 Hz.

D'autres activités rythmiques sont observées chez les sujets éveillés : le plus connu est le rythme " alpha " mis en évidence au début du vingtième siècle par Hans Berger. Ce rythme présente une fréquence comprise entre 8 et 12 Hz. Il est le plus visible au niveau du lobe occipital du cerveau, région dédiée au traitement des signaux visuels. Ce rythme est particulièrement développé chez le sujet calme, avec les yeux fermés. Cependant des études récentes ont également mis en évidence une modulation de ce rythme dans des tâches impliquant une forte attention visuelle. Dans ce contexte il a été suggéré que les oscillations alpha soient associées à une inhibition des régions cérébrales visuelles qui ne sont pas impliquées dans la tâche.

Une autre forme d'activité rythmique correspond aux oscillations gamma, avec une fréquence comprise entre 25 et 70 Hz. Initialement décrite dans le bulbe olfactif par Lord Adrian dans les années 1940-1950, cette activité rapide est également observée dans le lobe occipital. À ce niveau, sa présence dépend de la présentation de stimulations visuelles : leur présence et leur amplitude dépend de l'intensité (contraste) et de la dimension des stimulations visuelles : plus la stimulation est intense et/ou étendue, et plus leur amplitude augmente. Les oscillations gamma sont donc fortement associées au traitement de l'information visuelle.

Le projet présenté ici se concentre sur les rythmes alpha et gamma. D'un point de vue purement phénoménologique, ces activités rythmiques sont désormais bien caractérisées et bien connues. Cependant, l'origine et le rôle de ces activités oscillatoires ne sont que peu connues. Autrement dit, malgré les nombreux travaux réalisés au cours des trois dernières décennies, deux questions ne sont toujours pas résolues : comment sont générées ces oscillations, et quels sont leurs rôles fonctionnels ?

Pour répondre à ces questions il est nécessaire d'avoir accès à l'activité des neurones au sein du cortex visuel. Pour ce faire nous procéderons à l'enregistrement des activités cérébrales dans le cortex visuel primaire (aire V1) du lobe occipital chez le marmouset. Deux types d'activités seront ainsi enregistrées simultanément et par la même électrode : l'activité en potentiels d'action émis par des neurones individuels et les potentiels de champ (équivalent intra-crânien de l'électroencéphalogramme). De manière globale, notre projet consistera à examiner la relation entre l'amplitude de la réponse des neurones d'une part, et l'amplitude et la phase des oscillations du potentiel de champ d'autre part. De manière plus spécifique, plusieurs protocoles de stimulation visuelle seront utilisés afin de manipuler le contenu fréquentiel soit des stimulations elles-mêmes, soit des oscillations induites par les stimuli. Quatre protocoles ont été retenus :

Le premier a pour but de mieux préciser les fréquences de stimulation auxquelles les neurones visuels répondent le mieux.

Le second permettra d'explorer l'effet de la taille et du contraste des stimuli sur la présence et l'amplitude des oscillations gamma d'une part, et la réponse des neurones d'autre part. Il s'agira en particulier d'établir une relation de causalité entre les deux types de phénomènes.

Le troisième protocole abordera la même question avec un stimulus induisant préférentiellement des oscillations alpha.

Les trois premiers protocoles reposent sur l'utilisation de stimuli " artificiels " (réseaux de luminance, barres et bordures de contraste). L'avantage de ces stimuli est qu'il est possible de varier un paramètre indépendamment des autres (par exemple augmenter la taille tout en gardant le contraste constant), ce qui facilite l'analyse et l'interprétation des résultats. Cependant, leurs caractéristiques sont loin de celles des scènes naturelles. Le quatrième protocole consistera à examiner les mêmes questions mais en utilisant des stimuli qui seront progressivement complexifiés de façon à les rendre plus proches des scènes naturelles.

Cette étude sera réalisée par enregistrement électrophysiologique dans l'aire V1 du marmouset anesthésié.

Une bonne compréhension des mécanismes neuronaux à l'origine de la perception visuelle nécessite d'intégrer plusieurs niveaux d'analyse, et pour cette raison ne peut être appréhendé sur un modèle expérimental type culture de cellules : par exemple, l'organisation des connexions intracérébrales, qui constituent le socle des études électrophysiologiques, ne peut pas être mimé dans toute sa complexité en culture de cellules. La durée prévue du projet est de 5 ans. La fourchette haute du nombre d'animaux estimée pour notre projet est de 18 marmousets et ce nombre sera inférieur si nos objectifs peuvent être atteints avec un nombre moindre d'animaux. Nous réaliserons les expériences en aigu, 24 heures sur 24, et sur trois jours en général, ce qui permet de grandement limiter le nombre d'animaux nécessaires. Dans le cadre des 3R, nous souhaitons profiter de cette étude pour tester des microélectrodes prototypes, en cours de développement dans un laboratoire privé et dans un laboratoire public. Ces électrodes sont destinées à l'enregistrement et à la stimulation chez l'humain. Ces microélectrodes seront disponibles sous la forme de " tetrodes ". Toujours dans le cadre des 3R, l'avantage des tetrodes est de permettre l'enregistrement simultané de plusieurs neurones (5-6 en moyenne, et jusqu'à 11) alors que les microélectrodes classiques ne permettent de n'enregistrer que 1-2 neurones à la fois. À la fin de l'expérience les animaux seront euthanasiés. Nous procéderons ensuite à un prélèvement du cerveau après fixation pour examen histologique. Le but de cet examen histologique est de déterminer le positionnement des sites d'enregistrement dans le cortex, mais, dans le cadre des 3R les cerveaux prélevés seront également utilisés pour des études neuroanatomiques.

**9247** Les réseaux neuronaux de l'hippocampe sont cruciaux pour les fonctions cérébrales supérieures telles que les processus d'apprentissage et la mémoire.

De nombreux travaux chez l'homme et le rongeur ont pu montrer que la mémoire se met en place progressivement au cours du développement, mais les relations entre la mise en place de la mémoire et celle des structures cérébrales qui sont impliquées restent peu connues, en particulier parce que nos connaissances sur le développement de ces structures restent parcellaires.

Dans ce contexte, notre but est d'analyser le développement de la morphologie et de la connectivité des neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe générés à différents stades de vie. En effet, cette structure présente la particularité d'être un site neurogénique permanent (création de nouveaux neurones tout au long de la vie) ce qui soulève la possibilité que les neurones générés à différents stades de vie s'intègrent différemment dans le réseau hippocampique en raison de différences dans le développement de leur connectivité.

Cette étude sera menée sur des souris de différents âges permettant d'étudier la dynamique de développement des neurones granulaires générés en période embryonnaire, périnatale, néonatale, juvénile, adolescente et adulte. Nous mettrons en œuvre des approches chirurgicales pour injecter des préparations permettant de visualiser les neurones granulaires et leurs connexions. Après intégration de ces préparations dans la structure d'intérêt, une étude anatomique sera réalisée. Nous estimons le nombre maximal d'animaux nécessaires à 940 souris.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous

prévoyons un maximum de 8 souris par groupe, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, anti-douleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux opérations chirurgicales. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles in vitro.

**9248** Les troubles de la fertilité humaine sont en constante augmentation. Environ 20% des couples consultent pour des difficultés à procréer. Les causes d'infertilité sont encore très peu connues. Le but de nos travaux est d'identifier les gènes impliqués et de comprendre comment ils fonctionnent.

Notre étude traite plusieurs questions liées à la fertilité :

- Comment se fait la transformation des cellules germinales rondes en spermatozoïdes matures, mobiles et fécondants?
- Comment le spermatozoïde reconnaît et féconde l'ovule?
- Comment améliorer les conditions de culture de l'ovule et de l'embryon pour augmenter l'efficacité de la fécondation in vitro?

Au total, 2585 souris seront utilisées au maximum.

Dix modèles de souris transgéniques seront générés pour répondre à ces questions. La fertilité des souris mâles sera testée « in vivo » par mise en accouplement avec des femelles et « in vitro » par mise en présence des spermatozoïdes issus de ces mâles avec les ovules de femelles préalablement super ovulées. Chez la souris comme dans l'espèce humaine, les femelles ne produisent à chaque cycle que quelques ovules. L'injection d'hormones permet une super ovulation assurant la maturation de 3 à 4 fois plus d'ovules qu'en cycle spontané. De nombreuses femelles sont néanmoins nécessaires pour obtenir des ovules en grand nombre pour les analyses in vitro, en particulier. Après fécondation, un lot de femelles sera suivi en imagerie pendant leur gestation pour analyser l'implantation et le développement des embryons. Pour suivre le développement des spermatozoïdes « in vivo », des souris mâles (50 maximum pour l'étude de l'ensemble de nos modèles) recevront une injection de BrdU, un produit n'entraînant pas de phénotype dommageable qui permet d'étudier la prolifération des cellules.

L'ensemble des animaux injectés (avec hormones ou BrdU) sera euthanasié pour prélèvement d'organes dans un délai de 2 à 60 heures après l'injection.

Ce projet sera réalisé chez la souris, modèle animal dans lequel la majorité des gènes, notamment ceux impliqués dans la fertilité, sont similaires à ceux de l'Homme.

Dans le cadre de ce projet, il n'a pas été possible de contourner l'utilisation de modèles animaux par celle de méthodes alternatives car il n'existe pas à ce jour de techniques permettant de reproduire « in vitro » l'ensemble de la spermatogénèse ; en l'occurrence, il n'existe pas de lignées cellulaires dérivées de cellules germinales en cours de différenciation. L'étude in vitro de ce processus cellulaire est donc très limitée. Cependant, à chaque fois que cela sera possible, des lignées cellulaires transfectées avec les gènes d'intérêt seront utilisées pour les étapes de mise au point afin de réduire au strict minimum le nombre de souris utilisées.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. A chaque fois que cela sera possible, des modèles cellulaires in vitro seront développés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce sera le cas, pour certaines études de biologie moléculaire et cellulaire. Cependant il n'est pas possible de contourner le recours au modèle animal car la production de spermatozoïdes et d'ovules ne peut pas être réalisée in vitro.

Afin de limiter le nombre de souris produites pour nos analyses, les mêmes souris seront utilisées dans un premier temps pour les croisements (in vivo), ceci permettant d'évaluer la fertilité générale, puis, après euthanasie, leurs ovules et spermatozoïdes feront l'objet d'analyses in vitro.

Par ailleurs, nous aurons recours à l'imagerie afin de réaliser des échographies non invasives, réalisées sous anesthésie générale, pour suivre la gestation afin, là encore, de réduire le nombre de souris utilisées.

Au sein de l'animalerie, zootechniciens et personnels d'équipe de recherche veilleront quotidiennement au bien-être des animaux et contrôleront leur état de santé. Les animaux disposeront de cotons et d'abris adaptés, pour enrichir leur environnement.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse éventuellement infligées, la procédure d'échographie sera réalisée sous anesthésie générale ; l'administration d'antalgiques est prévue, dans le cas où un signe de souffrance de l'animal serait détecté lors de toutes les procédures.

A terme, les résultats de nos travaux devraient permettre de mieux comprendre les causes de l'infertilité et d'améliorer la prise en charge des couples ayant recours à l'assistance médicale à la procréation.

**9249** Le traitement des cancers du sein dit « triple-négatif » (CSTN), dont la plupart sont des cancers agressifs, repose sur la chimiothérapie pré-opératoire, basée sur la combinaison standard « anthracycline + taxane ». La disparition des cellules tumorales invasives dans le sein et les ganglions (appelée réponse histologique complète, RCH), après ce traitement, est associée à une survie prolongée des patientes. Néanmoins, la RCH est observée chez seulement 20 à 35% des patientes. La présence de la tumeur résiduelle (réponse histologique incomplète) après traitement comporte un risque important de développement des métastases viscérales (cerveau, poumon, foie). La survie des patientes ayant un CSTN métastatique est seulement de 12 à 18 mois, car durant cette phase la maladie présente une résistance augmentée à l'arsenal thérapeutique actuel.

Il est donc urgent de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour le CSTN.

De nombreux inhibiteurs sont en développement pour les différents cancers mais, jusqu'à présent, aucun n'est intégré dans le traitement du CSTN. Ces inhibiteurs démontrent souvent un effet anti-cancéreux temporaire, suivi du développement de la résistance au traitement. De plus, ces inhibiteurs montrent souvent une importante toxicité, limitant leur utilisation en clinique.

L'homoharringtonine (HHT) est un alcaloïde, présent dans les feuilles d'un conifère asiatique, *Cephalotaxus harringtonia*. C'est un inhibiteur de la synthèse des protéines. Depuis plusieurs décennies, l'HHT est utilisé comme anti-leucémique en Chine. L'HHT a été enregistré par la FDA en 2012, pour le traitement des patients atteints de leucémie myéloïde chronique résistante à au moins 2 traitements anti-cancéreux (imatinib, dasatinib...). Les études sur cellules et sur l'animal ont confirmé l'activité anti-cancéreuse de l'HHT dans plusieurs hémopathies malignes (leucémie aigüe myéloïde, leucémie lymphoïde chronique, lymphomes, myélome). Néanmoins, l'effet de l'HHT sur les cellules des cancers solides et, notamment, du cancer du sein, a été très peu étudié.

Nous avons testé l'activité de l'HHT sur des cellules représentant le CSTN, et obtenu les résultats très encourageants : l'HHT réduit la viabilité de ces cellules de 50% à 90%, après seulement 48h d'incubation. Vu cette efficacité importante, nous souhaitons évaluer l'effet de l'HHT chez des souris portant différents types de tumeurs de cancer du sein. A cette fin, nous allons d'abord déterminer la Dose Maximale Tolérable (DMT) de l'HHT pour les souris et ensuite procéder au traitement des souris par l'HHT afin d'en évaluer l'efficacité thérapeutique.

Ces expériences seront réalisées dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner), utilisant des conditions de stabulation, de bien-être animal et un nombre de souris optimisés. Une observation journalière des animaux est assurée par la personne chargée de l'expérimentation. Cette observation consiste à vérifier l'état et le comportement général des souris. Lors des procédures expérimentales (inoculation des cellules et traitement), les souris seront placées sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation. L'ensemble du projet comprendra 90 souris sur 12 mois.

**9250** L'autogreffe osseuse est actuellement la méthode la plus efficace pour combler les pertes de substance osseuse chez l'homme. Elle présente cependant des inconvénients importants comme la survenue d'hématomes, d'infections et de douleurs persistantes au site de prélèvement. De plus, la quantité d'os prélevée est très souvent insuffisante. Notre objectif général est donc de développer de nouveaux substituts osseux, faciles à transférer en pratique clinique et qui pourraient se substituer, avec la même efficacité, à l'autogreffe. Au laboratoire, nous avons mis au point un biomatériau, appelé BRB, constitué de sang total coagulé autour de particules de phosphate de calcium biphasé (BCP) de 0,08-0,2 mm. Les propriétés ostéogéniques, c'est-à-dire la capacité du BRB à générer de

l'os, ont été démontrées grâce aux expériences d'implantation sous-cutanées (SC) chez la souris et d'implantation en site osseux chez le rat. Parallèlement, nous avons montré que l'implantation SC chez la souris de microparticules de BCP de taille supérieure (0,2-0,5 mm) englobées dans du sang coagulé, induisait majoritairement un tissu fibreux. Par conséquent, l'étude comparative des protéines induites, dans les implants ostéoinducteurs (0,08-0,2mm) et fibroinducteurs (0,2-0,5mm) devrait permettre d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la reconstruction osseuse de ce nouveau biomatériau.

Dans ce protocole, après avoir identifié la/les cellules du sang et la/les protéines clés responsables de la reconstruction osseuse du BRB, nous essaierons de générer un BRB+, capable de synthétiser plus rapidement du tissu osseux que le BRB classique.

Cette étude sera réalisée en 3 étapes avec la même procédure expérimentale : mise en place en SC dorsal de 2 implants de biomatériaux d'environ 0,25 cm<sup>3</sup> chacun, chez des souris Nude. Les implants seront prélevés 2 semaines plus tard après euthanasie des souris par dislocation cervicale.

- L'étape N°1 permettra d'identifier la ou les cellules nécessaires à la génération de tissu osseux par le BRB.

Pour la réalisation de cette étape, 56 souris seront nécessaires. Elles seront réparties en 7 groupes de 8 souris, recevant chacune 2 implants constitués de particules de BCP 0,08-0,2mm et de sang humain coagulé, déplété ou non en différents types cellulaires ou avec du plasma.

- L'étape N°2 permettra d'identifier une ou plusieurs protéines clés impliquées dans l'ostéogénèse du BRB en comparant les protéines des implants réalisés des particules de BCP de 0,08-0,2mm ou 0,2-0,5 mm englobées dans du sang humain coagulé. Ce travail nécessitera 24 souris réparties en 2 groupes. Les animaux seront euthanasiés 2 semaines après la mise en place des implants.

- A l'étape N°3, nous testerons l'hypothèse selon laquelle le pouvoir ostéogénique du BRB pourrait être renforcé par l'adjonction de la protéine « x », identifiée à l'étape précédente.

Cette étude sera effectuée chez 40 souris recevant chacune 1 seul implant réalisé avec des particules 0,08-0,2mm. Les animaux seront ensuite répartis en 5 groupes de 8 souris : le groupe "témoin" (implants réalisés avec du sang normal), les groupes X1+ et X2+ (implants préparés avec du sang supplémenté avec 2 concentrations différentes de la protéine « x ») et les groupes X1- et X2- (implants réalisés avec du sang contenant 2 concentrations différentes d'un anticorps neutralisant la protéine « x »).

Par conséquent, ce projet nécessitera :  $56 + 24 + 40 = 120$  souris Nude au total.

En terme de Remplacement : actuellement, il n'existe pas de méthode efficace in vitro permettant d'éviter l'expérimentation animale pour tester le pouvoir ostéogénique de biomatériaux destinés à accélérer la régénération osseuse. Cependant, des expériences préliminaires réalisées in vitro, nous ont permis d'adapter au mieux notre protocole.

En terme de Réduction : nous avons calculé le nombre minimum de souris nécessaire mais suffisant pour réaliser des études statistiquement fiables (test de Mann-Whitney qui permet la comparaison d'échantillons de petites tailles ( $n < 10$ )). La quantité de tissu osseux présent dans les implants « expérimentaux » sera comparée à celle observée dans les implants de BRB (implants de référence).

En terme de Raffinement : nous avons choisi le mode d'implantation par voie SC qui est beaucoup moins traumatisant pour l'animal qu'une implantation en site osseux. De plus, les souris seront visitées régulièrement afin i) de détecter tous les signes de souffrance/inconfort et ii) de mettre en place des traitements/solutions adaptés aux problèmes identifiés (voir grille de score : annexe 1 bis).

**9251** La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires (chorée), déficits cognitifs et troubles de la personnalité et s'expliquent par une atteinte préférentielle du striatum dans le cerveau. Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques est nécessaire pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Nous avons récemment identifié un nouveau mécanisme impliqué dans le processus pathogénique de la maladie et cherchons à mieux caractériser et valider sur le plan thérapeutique des acteurs clés de ce mécanisme. Dans ce but, nous avons recours à des modèles murins de la maladie de Huntington. A l'heure actuelle, ce projet ne peut ni être réalisé à l'aide de modèles cellulaires, ni être simulé par des



techniques informatiques. Les souris modèles étudiées dans le cadre de ce projet, sont nées et élevées dans des élevages agréés. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris au minimum nécessaire (i.e. 702 souris) pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ce nombre (comprenant des groupes contrôles) a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique. Ainsi, pour les études comportementales, compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres évalués, des groupes de 12 animaux sont nécessaires pour montrer des différences inter-groupes significatives, alors que pour les analyses biochimiques et histologiques, la variabilité interindividuelle étant plus faible, des groupes de 8 souris sont suffisants. Dans un souci de raffinement, les animaux seront utilisés à un âge symptomatique précoce (14 semaines). L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des rongeurs.

**9252** La radiothérapie reste aujourd'hui incontournable dans la prise en charge des cancers de l'abdomen. Le but de la radiothérapie est de diminuer la tumeur tout en préservant les tissus sains environnants. L'irradiation des zones saines peut entraîner une perte de l'intégrité intestinale aboutissant à des complications gastro-intestinales précoces et tardives chez certains patients pouvant être très invalidantes. Actuellement, les cliniciens disposent d'un arsenal thérapeutique permettant de soulager les symptômes, mais aucun traitement curatif n'est disponible. Depuis maintenant plusieurs années, une stratégie thérapeutique utilisant la thérapie cellulaire et les Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) issues de la moelle osseuse ou du tissu adipeux a ouvert de nouveaux espoirs thérapeutiques dans le domaine du traitement des lésions tissulaires radio-induites.

La greffe de CSM a été appliquée à titre compassionnel pour la première fois à une victime souffrant de brûlures radiologiques sévères de la peau. Les résultats obtenus ont été spectaculaires et ont permis aux patients traités de retrouver l'usage de leurs membres, ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle. D'autres études cliniques ont montré une efficacité thérapeutique des CSM pour le traitement des atteintes gastro-intestinales. En effet, les CSM semblent réverser les perforations de côlons causées par des maladies immunitaires. De même, des travaux antérieurs ont montré une efficacité des CSM dans les processus de réparation structurale et fonctionnelle des atteintes digestives induites par une irradiation chez le rat et le « mini pig ». Cependant, la cicatrisation par les CSM n'est pas complète et nécessite l'injection d'une grande quantité de ces cellules.

L'objectif de ce projet est de développer une stratégie innovante basée sur le principe de l'ingénierie tissulaire en combinant thérapie cellulaire et biomatériau afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique des CSM pour le traitement des ulcères colorectaux sévères induits après irradiation chez le rat (860 animaux). Pour évaluer l'efficacité thérapeutique d'un traitement, il est nécessaire d'utiliser un modèle intégré in vivo. De plus l'effet de ces traitements, pour qu'ils soient pertinents, nécessitent leur interaction avec les différents compartiments du côlon, condition retrouvée chez le modèle animal intégré.

Cette stratégie de médecine régénérative vise à

- implanter un feuillet de CSM lors de l'acte chirurgical réalisé pour enlever la partie endommagée du colon.

- tester l'implantation d'un dispositif médical innovant composé d'un biomatériau et de cellules par coloscopie.

Cette étude vise à apporter des preuves de concept précliniques pour une utilisation future de ces combinaisons pour des patients développant des complications sévères de la radiothérapie suite à un cancer de la zone abdomino-pelvienne.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les

animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, grilles de score).

**9253** La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires (chorée), déficits cognitifs et troubles de la personnalité et s'expliquent par une atteinte préférentielle du striatum dans le cerveau. De nombreux modèles murins ont été générés, dont les souris R6/1 et les souris knockin CAG140. Ces modèles récapitulent des phénotypes majeurs de la maladie et constituent un outil inestimable pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et la réalisation de traitements précliniques. Alors que le phénotype moteur des souris "Huntington" a été largement étudié et est utilisé comme marqueur lors des tests précliniques, le phénotype cognitif reste peu caractérisé. L'atteinte des fonctions cognitives, incluant des difficultés à mobiliser les connaissances acquises, à s'organiser et à prendre des décisions est pourtant un symptôme et marqueur précoce de la maladie, qui a un impact substantiel sur la qualité de vie des patients. Ainsi, une meilleure caractérisation des fonctions cognitives chez les souris modèles Huntington apparaît aujourd'hui nécessaire non seulement pour comprendre les mécanismes responsables des atteintes cognitives mais aussi pour évaluer de façon précoce les bénéfices potentiels d'un traitement lors de la réalisation de test précliniques. L'objectif de l'étude proposée est de caractériser la mémoire procédurale des souris R6/1 et KI CAG140 à l'aide d'un nouveau test de comportement, une version « sèche » du labyrinthe du double-H. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=612). Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée de façon générale à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers. La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative complexe qui affecte plusieurs structures du cerveau. Les modèles murins de la maladie, dont les modèles R6/1 et KI CAG140, qui récapitulent des phénotypes majeurs de la maladie, sont des outils précieux pour l'étude des mécanismes physiopathologiques. La caractérisation approfondie des déficits cognitifs, en particulier la mise en évidence d'altérations au niveau de la dynamique d'interaction entre les systèmes de mémoire ne peut être réalisée qu'à partir d'animaux pourvus d'un système nerveux développé et modélisant ces phénotypes.

**9254** De plus en plus d'études montrent un lien évident entre de nombreuses pathologies et un dysfonctionnement du microbiote intestinal, anciennement appelée flore intestinale. La liste de ces maladies ne cesse de s'allonger : cela va des maladies chroniques (obésité, diabète, intestin irritable) aux maladies neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer. Il existe à l'heure actuelle quelques traitements efficaces basés sur ce principe contre certaines pathologies du tube digestif : La greffe fécale pour le traitement de la colite à *Clostridium difficile* ne fonctionne pas toujours. De même, des traitements par prise orale de microorganismes bénéfiques à l'équilibre du microbiote, les probiotiques, ne sont plus efficaces dès l'arrêt du traitement. Nous proposons une nouvelle approche thérapeutique pour soigner ces maladies en implantant à demeure dans l'intestin un modulateur de microbiote. Notre dispositif, appelé symbiote, est constitué d'un « réacteur » qui flotte dans l'intestin. Ce réacteur est susceptible d'être colonisé par des bactéries bénéfiques. C'est la présence au long terme de ces probiotiques qui va permettre d'éliminer certaines molécules présentes dans la lumière intestinale, de produire des ions ou molécules d'intérêt thérapeutique et également de modifier le microbiote intestinal responsable de pathologies.

La présente étude expérimentale de preuve de concept chez le rongeur a pour but de :

- Démontrer la tolérance par le tractus digestif de la présence permanente du dispositif "Symbiote" allant de l'estomac au duodénum et au début du jéjunum,
- Identifier la flore intestinale susceptible de coloniser spontanément le dispositif "Symbiote",
- Evaluer l'impact, sur la prise de poids et sur les paramètres physiologiques, de la présence du Symbiote.

Les résultats attendus sont considérables car le développement de cet outil permettra l'étude du microbiote et de sa modulation sur rongeur où des nombreux modèles pathologiques sont déjà accessibles.

Remplacer :

Ce symbiote est actuellement en cours de test chez le cochon par pose endoscopique. La miniaturisation du dispositif chez le rongeur permet de faciliter l'étude de l'impact potentiel du Symbiote en pré-clinique

Réduire :

41 rats seront nécessaires pour mener à bien cette étude de preuve de concept. C'est le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats cohérents analysable par des statistiques fiables.

Raffiner :

La pose du symbiote ne doit pas générer de gêne ni de douleur autre que celle de l'opération chirurgicale et du suivi post-opératoire, gérés par des anesthésies et analgésies. Les animaux seront euthanasiés si la gêne digestive s'avère trop importante grâce au suivi des points limites.

**9255** Les maladies allergiques d'origines cutanées (p.ex., la dermatite atopique ou l'hypersensibilité de contact), respiratoires (p.ex., l'asthme allergique) ou alimentaires sont en plein essor dans les pays développés. Il est maintenant estimé qu'un tiers des français souffrent d'une ou plusieurs formes de maladies allergiques, dont certaines peuvent s'avérer fatales (p.ex., certaines formes d'asthmes réfractaires aux corticoïdes ou encore des chocs induits par l'ingestion de cacahuètes). L'origine des diverses maladies allergiques chez l'homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p.ex., immunologique, génétique, environnemental, neuronal etc) sont suspectés d'être impliqués dans leur développement. Ce programme de recherche a pour but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement et la prévention des maladies allergiques en bloquant les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. De ce fait, les modèles de souris sont des éléments clé et incontournables pour étudier le développement des maladies allergiques mimant les maladies humaines. Les expériences qui seront réalisées in vivo ont été conçues de façon à n'utiliser que le nombre strictement minimum de souris nécessaire à l'obtention de données validées statistiquement. D'autre part, toutes les précautions seront prises pour éviter la sensation de douleur ou d'angoisse. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser (utilisant 2156 animaux pour la totalité des projets) contribueront à mieux comprendre le développement des maladies allergiques et potentiellement à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies.

**9256** La maladie à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer (MA). Elle commence entre 50 et 85 ans et représente 20% des patients déments. Le nombre de patients MCL en France est estimé à environ 200000. Les symptômes habituels de la MCL associent des troubles cognitifs comme des troubles de la mémoire, des troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), un syndrome parkinsonien - souvent discret en début de maladie- et des fluctuations attentionnelles. Au niveau cérébral, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats de protéines d'alpha-synucléine (AS), formant ce que l'on appelle les corps de Lewy. On retrouve ces agrégats dans la maladie de Parkinson (MP), sauf qu'ils sont localisés dans la substance noire, alors que dans la MCL, ils sont diffus dans l'ensemble du cerveau. Des agrégats d'AS sont notamment retrouvés dans l'hippocampe des patients MCL. L'hippocampe joue un rôle essentiel dans les processus de mémorisation et est une des premières structures impactées dans la MA. L'atteinte de l'hippocampe dans la MCL pourrait ainsi expliquer en partie la similitude des troubles cognitifs avec la MA. Les modèles animaux existant à l'heure actuelle sont créés pour modéliser la MP et présentent souvent cette atteinte prédominante de la substance noire.

Dans le cadre de l'étude de modèles murins de la MP, plusieurs équipes se sont penchées sur l'injection d'AS structurellement anormale et en partie agrégée (fibrilles) dans diverses structures cérébrales. Ces fibrilles sont capables de modifier la structure de l'AS endogène et ainsi de

transmettre et de propager à la manière des protéines prions ces protéines anormales. Ces études ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'injection de ces fibrilles afin d'obtenir des modèles souris de MP.

Ce projet vise à injecter des fibrilles d'AS humaine dans l'hippocampe d'un modèle de souris surexprimant l'AS humaine de façon diffuse dans le cerveau, et d'en étudier les conséquences neuroanatomiques et fonctionnelles (comportement).

Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous ne travaillerons qu'avec des souris mâles, qu'en plus de notre groupe de souris injectées avec des fibrilles, nous constituerons plusieurs groupes contrôles, groupes que nous étudierons à différents délais post-injection, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 90 souris. Afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début des tests comportementaux. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage, de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction). Dans la mesure où nos travaux portent sur les fonctions mnésiques et motrices, il est impossible de recourir à un autre type de modèle d'étude de type culture cellulaire ou organe isolé. L'utilisation de l'animal entier éveillé s'impose, car celui-ci doit être soumis à des tests comportementaux

**9257** Le trait drépanocytaire (TD) est une forme bénigne de la drépanocytose, une maladie du sang. Le TD est très fréquent dans les populations d'Afrique où le diabète de type 2 (DT2) est aussi très fréquent. Ainsi, un nombre important d'individus est susceptible d'être à la fois porteur du TD et DT2. Bien que le TD soit généralement considéré comme asymptomatique, il a été récemment démontré que les patients diabétiques porteurs du TD (DT2TD) présentaient des altérations plus marquées au niveau du fonctionnement des vaisseaux sanguins comparé à des patients diabétiques non porteurs du TD. Une dysfonction vasculaire chez un modèle murin DT2TD a également été récemment observée (résultats non publiés). Cependant, les mécanismes de ces altérations du fonctionnement vasculaire plus marquées chez les DT2TD sont inconnus. L'objectif de cette étude est d'étudier les mécanismes impliqués dans ces dysfonctions vasculaires. Les résultats issus de ces études permettront d'approfondir les connaissances sur le DT2TD et pourrait aboutir à de nouvelles voies de traitement permettant de retarder la survenue de complications cardiovasculaires. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée.

La règle des 3R a été appliquée à ce projet. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Ce projet concernera 200 souris au maximum.

**9258** La pathologie de la paroi abdominale est l'une des pathologies chirurgicales les plus fréquentes. La Hernie inguinale se distingue par sa prévalence. En plus des problèmes de santé qu'elle engendre, elle entraîne également des problèmes d'absentéisme, du fait qu'elle affecte le plus souvent les hommes en âge de travailler. Dans une large mesure, cela est lié au repos postopératoire après la réparation chirurgicale. Pour cette raison, on tente de plus en plus de réduire la convalescence après la chirurgie. L'histoire de la chirurgie de la paroi abdominale, en particulier la hernie inguinale, a eu plusieurs étapes. Au début, elle consistait en des réparations par laparotomie, et diverses techniques anatomiques ont été développées. Aucune technique n'a prédominé sur une autre, toutes ont obtenu des bons résultats. Ensuite, l'émergence des techniques utilisant des prothèses a permis de réduire le taux de récurrence. À ce stade de l'histoire, l'évolution de la technique chirurgicale a donné lieu à un grand développement de différents types de matériaux prothétiques. Des matériaux non résorbables qui ont généré une fibrose locale sont apparus. Puis des matériaux biodégradables, compatibles avec le contact direct avec les viscères, ont été développés, dont l'intention était d'éviter les complications,

notamment les fistules digestives, secondaires à un contact prolongé entre le matériel prothétique et un segment intestinal. Ces matériaux ont ensuite été appliqués par une approche mini-invasive. Actuellement, les différentes techniques laparoscopiques, TAPP et TEP, sont pratiquées dans les centres chirurgicaux de pointe, avec des résultats sensiblement supérieurs aux techniques « ouvertes », en termes de récupération postopératoire et de qualité de vie. Néanmoins, la diffusion de cette approche chirurgicale reste encore limitée, et il y a certainement une place pour l'innovation, en termes de matériaux et de modalités d'application. L'idée de ce projet est de développer une technique de réparation guidée par l'image qui permet l'injection per-cutanée d'un matériau semblable à un gel liquide qui se solidifie rapidement après son application et constitue un renforcement/une réparation de la paroi abdominale. Dans ce travail, nous allons essayer d'analyser un nouveau matériau qui consiste en un gel liquide qui se solidifie 15 minutes après son application. Les hydrogels hybrides proposés sont constitués d'un réseau chimique organique biocompatible réticulé et de nanoparticules de silice mésoporeuses pour en augmenter l'élasticité.

L'objectif de cette étude est de comparer, entre le nouveau matériel et un groupe témoin, les résultats des variables suivantes : infection, réaction inflammatoire, fibrose et résistance mécanique.

Le projet est conforme aux conditions 3R :

Remplacement : afin d'évaluer les complications, la durée des procédures, la sécurité et l'efficacité des approches percutanées, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants. Le rat est le modèle très commun utilisé pour sa taille et sa manipulation facile.

Réduction : il s'agit d'une étude pilote pour laquelle il n'existe pas de base statistique permettant de définir le nombre d'animaux nécessaires. Cependant, le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé pour minimiser la quantité nécessaire. Par conséquent, selon le principe de réduction et selon notre expérience, nous estimons que 18 animaux seront nécessaires pour cette étude.

Raffinement : toutes les procédures doivent être réalisées sous anesthésie générale et avec contrôle de la douleur pendant l'opération, ainsi que pendant la période de survie. Les contrôles postopératoires ne seront effectués que par un personnel hautement qualifié

**9259** Dans nos sociétés vieillissantes, les problèmes de mémoire liés à des conditions pathologiques ou à l'âge prennent une place grandissante. Il devient donc crucial de comprendre les mécanismes neurobiologiques de la mémoire pour améliorer les diagnostics médicaux et développer de futurs traitements. Notre travail vise précisément à comprendre le fonctionnement du cerveau à l'échelle des réseaux neuronaux, lorsque celui-ci forme et manipule des souvenirs. Les résultats issus de nos travaux auront donc des implications importantes dans le domaine de la santé, pour l'amélioration des conditions de vie humaine.

La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés et l'étude de fonctions cognitives complexes. L'organisation cérébrale chez cette espèce est relativement proche de celle de l'Homme, ce qui permet d'exploiter les résultats obtenus pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la fonction mnésique dans l'espèce humaine.

Nous mettrons en œuvre des tâches comportementales qui reflètent les comportements naturels des animaux utilisés. L'odorat est une modalité sensorielle majeure chez les souris, nécessaire à l'établissement de comportements cruciaux pour la survie de l'individu (alimentation, reproduction, interactions sociales...). La signification associée aux odeurs rencontrées, qui permet la production de comportements adaptés, est le plus souvent apprise par expérience.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes neuronaux mis en place quand l'animal forme et manipule un souvenir en lien avec l'olfaction. Ceci sera mis en œuvre dans le cadre de 3 tâches comportementales :

- 1) l'apprentissage d'une association entre une odeur et une récompense
- 2) l'apprentissage d'une association entre une odeur et une trajectoire dans un labyrinthe,
- 3) un test de reconnaissance sociale (cette mémoire, mise en jeu en conditions naturelles, se base principalement sur l'olfaction et permet la reconnaissance entre individus).

Au cours de ces tâches, nous enregistrerons, en simultané, l'activité de dizaines de neurones grâce à des électrodes très fines placées au préalable dans les régions cérébrales impliquées. La richesse des informations collectées et le grand nombre de neurones enregistrés via cette méthode sont tels, qu'il nous sera possible de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés.

En complément, nous testerons l'impact de sous-populations de neurones sur l'activité du réseau et le comportement de l'animal, en contrôlant leur activité avec une grande précision spatio-temporelle. Les lignées de souris nécessaires à l'utilisation de cette technique ne présentent pas de phénotypes dommageables.

Les procédures de ce projet sont les suivantes :

- Restriction en eau de boisson, nécessaire à l'entraînement des animaux : l'eau est offerte comme récompense et devient source de motivation.
- Chirurgies cérébrales sous anesthésie profonde et analgésie : pour placer les outils nécessaires aux enregistrements et à la manipulation des circuits neuronaux
- Euthanasie : pour prélèvement des cerveaux et étude des tissus cérébraux

• Remplacement :

La souris est une espèce de choix pour étudier le système nerveux central des Vertébrés qui permet d'obtenir des informations en grande partie transposables chez l'Homme. Ce projet vise à comprendre les mécanismes à la base d'une fonction cognitive complexe : la formation des traces mnésiques olfactives à l'échelle du cerveau entier. Le cerveau doit donc être intact pour que les connexions entre les différentes régions cérébrales soient préservées et que nous puissions étudier leurs activations coordonnées. De plus, nous étudions les circuits neuronaux chez le sujet en train d'apprendre : il nous faut donc travailler avec des animaux vigiles. Il nous est donc impossible de conduire cette étude in vitro sur des cultures de neurones dissociés. Enfin, dans l'état des connaissances actuelles, les questions que nous adressons ne peuvent malheureusement pas être réalisées in silico.

• Réduction :

Le nombre total d'animaux requis pour ce projet est de 210 souris sur 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum grâce aux techniques d'enregistrement utilisées qui permettent de collecter un grand volume de données sur plusieurs jours. Ce nombre sera réduit davantage grâce à nos études pilotes qui permettront une optimisation des paramètres de nos expériences. De plus, nous utiliserons des animaux identiques sur le plan génétique, de manière à limiter davantage la variabilité de nos résultats. Enfin, comme nous pourrons enregistrer l'activité des neurones sur plusieurs jours, un animal pourra être son propre contrôle : nous alternerons les conditions « test » et « contrôle » d'une session à l'autre avec les mêmes souris, plutôt que d'utiliser deux groupes de souris pour chacune des conditions. Cette approche permettra de réduire considérablement le nombre de souris.

• Raffinement :

Nos souris seront hébergées en portoir ventilé, dans des conditions qui favorisent l'expression de leurs comportements naturels : petits groupes sociaux (maximum 4 souris par cage) jusqu'à l'étape de chirurgie, cages enrichies d'éléments permettant de construire un nid (carré de coton, petites maisons en carton, frises de papier kraft) ou de favoriser l'exploration (jouets). L'enrichissement des cages soulagera le stress lié à l'isolement nécessaire des souris suite aux chirurgies. Le bien-être de chaque animal sera évalué quotidiennement selon des critères objectifs. Chaque souris sera habituée à l'expérimentateur et à l'enceinte de test, pendant au moins 3 jours avant le début des tests, pour limiter le stress des manipulations. Une fiche de suivi individuel sera créée pour chaque procédure expérimentale. A partir des critères définis dans ces fiches, des points limites précoces seront établis pour éviter de prolonger toute souffrance.

L'euthanasie des animaux en fin d'expérimentation sera nécessaire pour prélever leur cerveau et faire l'analyse post-mortem des tissus cérébraux. Cette procédure sera réalisée par des expérimentateurs compétents et soucieux du bien-être animal, sous anesthésie profonde avec le degré d'analgésie recommandé par les services vétérinaires. L'euthanasie sera ainsi indolore pour les animaux, avec une perte de conscience rapide.

**9260** Au cours des dix dernières années, les peptides ont connu une augmentation de leur utilisation en médecine. Cependant, les peptides naturels sont souvent difficilement utilisables sans modification préalable de leur structure en raison de leur temps de demi-vie faible in vivo. Ainsi, ce projet multidisciplinaire, a pour but de développer une approche innovante afin d'augmenter le temps de demi-vie de ces peptides dans la circulation sanguine. Notre approche consiste à augmenter la

longueur du peptide afin d'obtenir de nouveaux conjugués peptidiques plus stables métaboliquement. Ces peptides sont l'apeline et la spexine.

L'objectif du projet d'imagerie est donc de déterminer la biodistribution et la biodisponibilité de ces composés après une administration par voie intra-veineuse mais également par voie orale et définir précisément les voies d'élimination et les zones potentielles d'accumulation afin d'anticiper une toxicité potentielle des fluoropeptides.

L'imagerie in vivo nous permettra également d'étudier la capacité des fluoropeptides à traverser les membranes (paroi intestinale, barrière hémato-encéphalique). Les résultats seront comparés à ceux obtenus avec le peptide natif et le lipopeptide correspondants (« gold standard »).

Retombées attendues : ce projet doit ouvrir la voie à l'utilisation des peptides comme outils thérapeutiques pour le traitement de maladies cardiovasculaires (apeline) et de la douleur (spexine).

10 molécules au maximum seront testées sur la durée du projet, à raison de 10 souris par groupe, ce qui porte à 400 animaux au maximum. Chaque animal aura une injection de la molécule à tester suivi des 9 examens d'imagerie TEP ou TEMP sur une période de 24 heures. Les examens et l'injection sont réalisés sous anesthésie gazeuse.

La règle des 3 R sera respectée.

Réduction : 10 animaux par groupe est le nombre minimum d'animaux par groupe pour pouvoir faire des tests statistiques (Mann Whitney) sur les résultats obtenus en tenant compte de la variabilité inter-individuelle. Le suivi longitudinal de la biodistribution des molécules en imagerie TEP permet également de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : les animaux sont hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement (cycle jour/nuit 12/12h, eau et nourriture ad libitum, et d'enrichissement (tunnels en PVC et ouate pour faire des nids) de leur environnement conformes à la validation du SBEA. Pendant la durée de l'étude les animaux sont manipulés et surveillés par du personnel qualifié : observation de la respiration et de la prostration. D'après les études préliminaires, il n'y a pas d'effet indésirable attendu. Pendant l'anesthésie et pendant le réveil les animaux sont monitorés (fréquence respiratoire et cardiaque) et maintenus au chaud;

Remplacement : la biodistribution et la biodisponibilité de ces molécules ne peut être observée que chez l'animal lors d'une étude in vivo.

**9261** Le syndrome néphrotique, caractérisé par une protéinurie massive, est causé par un large groupe de maladies dont la néphropathie glomérulaire et la glomérulosclérose segmentaire et focale. Bien que les mécanismes d'action commencent à être connus, le traitement n'est toujours pas spécifique à ce jour et est loin d'être suffisamment efficace. Il est donc important de tester de nouvelles molécules thérapeutiques pour leur efficacité sur la protéinurie induite par le développement d'un modèle de néphrite passive de Heymann, un modèle expérimental de néphropathie glomérulaire.

Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité thérapeutique sur la protéinurie d'une ou plusieurs molécule(s) client sur le modèle de néphrite passive de Heymann.

Le modèle de néphrite passive de Heymann sera induit sur des rats mâles selon la méthode décrite dans le projet précédent ayant reçu un avis favorable du comité d'éthique.

La ou les molécule(s) thérapeutique(s) à tester seront administrées à 1 ou 2 doses différentes, quotidiennement pendant 28 jours (du jour 15 au jour 42) soit par voie orale (per os), soit par voie intrapéritonéale (i.p.) soit par voie sous-cutanée (s.c.) soit par voie intraveineuse (i.v.). Un groupe d'animaux sera également inclus pour comparer l'efficacité du traitement à un contrôle positif. Ce contrôle positif sera administré à l'aide d'une pompe osmotique de type Alzet implantée en sous-cutané au jour 15. L'albumine et la créatinine seront mesurées dans des échantillons urinaires collectés une fois par semaine pendant 6 semaines. L'urine des animaux pourra également collectée pendant 24h à J14, J28 et J42 du protocole. Pour cela, les animaux seront placés dans des cages métaboliques. La créatinine sera également mesurée dans des échantillons de sang collectés après chaque séance en cage métabolique (J14, J28 et J42 (point final)).

Le nombre de rats nécessaire à ce projet est de 720 rats, à raison de 12 animaux par groupe ce qui est le minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs, sur 3 ou 4 groupes respectivement pour chaque étude (15 études sur 5 ans).

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 (tunnels en polycarbonate, aspen brick) afin de les stimuler. En accord avec la règle de raffinement, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse avec maintien de la température corporelle via l'utilisation d'une plaque chauffante. Le réveil des animaux sera surveillé attentivement et l'état générale des animaux contrôlé quotidiennement. L'utilisation de cages à métabolisme pour les récoltes urinaires nous permettra de mesurer la fonction rénale sans recours à l'euthanasie des animaux à différents temps. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle de réduction. Actuellement, aucune méthode alternative ne permet d'étudier dans son ensemble la néphropathie glomérulaire. Seule l'utilisation de modèles animaux développant une néphrite passive de Heymann permet de tester de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de cette pathologie (remplacement).

**9262** Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux et souffre d'un très mauvais pronostic dû en partie à un diagnostic tardif et à un manque de traitement efficace.

Nous souhaitons caractériser le rôle de protéines pouvant jouer un rôle majeur dans la réponse aux drogues chimiothérapeutiques utilisées en clinique (gemcitabine, 5-FU, irinotécan/SN-38 et oxaliplatine).

Notre objectif est de montrer in vivo l'effet chimioprotecteur de cette protéine lors de la cancérogenèse pancréatique (progression carcinogénétique, apparition et progression de métastase). Les retombées de ce projet fondamental permettront d'apporter aux cliniciens de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs permettant la prise en charge de la pathologie et notamment pour l'orientation vers le protocole chimiothérapeutique le plus efficace.

Le nombre d'animaux est justifié par la règle des 3R :

Remplacer : Il s'agit de l'étude d'un modèle physiopathologique préclinique de progression carcinogénétique dont la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro. Cette étude est basée sur des résultats très prometteurs obtenus in vitro via des modèles cellulaires. L'aspect de progression au cours de la carcinogenèse ne peut être abordé in vitro et donc nécessite l'expérimentation animale.

Réduire : Nous avons déjà sélectionné et n'étudierons que les protéines/miARN d'intérêt mises en évidence par des études in vitro. Le nombre d'échantillons nécessaires à ces études a été calculé pour atteindre un effectif suffisant pour obtenir des conclusions statistiquement significatives.

Raffiner : Les doses de chimiothérapie correspondent à des doses ayant une activité thérapeutique prouvée dans la littérature mais n'entraînant pas d'effets secondaires majeurs chez la souris. De plus; l'ensemble des organes d'intérêt (tumeurs et sites métastatiques tels que le foie et les poumons) seront prélevés sur un même animal après euthanasie des animaux.

Nombre d'animaux prévus : 360 souris

**9263** Le nombre de fumeurs de tabac est estimé à 1,1 milliard dans le monde. Le tabac est reconnu comme l'une des drogues les plus addictives, avec plus de 70% des fumeurs qui souhaitent arrêter et moins de 10% qui y parviennent sans soutien médical. Par ailleurs, si des thérapies disponibles peuvent être un soutien dans l'initiation de l'abstinence, elles ne sont efficaces que chez un nombre limité de patients et préviennent mal la rechute du comportement. Combattre la dépendance au tabac, c'est-à-dire aider les fumeurs à stopper durablement, est un défi sociétal majeur, car le tabac est à l'origine de maladies graves et souvent fatales comme le cancer du poumon. Il est nécessaire de développer de meilleures stratégies thérapeutiques et cela dépend de notre capacité à comprendre les mécanismes de la dépendance au tabac, dans lesquels la nicotine joue un rôle central.

Il apparaît de plus en plus évident que les fumeurs n'ont pas tous le même comportement, le même type de consommation, que les mécanismes ou les motifs de leur consommation peuvent être différents. La nicotine est le principal composé addictif du tabac et provoque une dépendance physique et une dépendance psychologique. Nous avons émis l'hypothèse que le rôle et le poids des dépendances physique et psychologique dans le maintien du tabagisme, varient selon les individus.



Nous étudions la prise de nicotine chez l'animal et comparons selon les individus les effets du changement dans la dose de nicotine et de la manipulation de l'environnement.

Nous étudions les mécanismes cérébraux qui expliquent ces différences individuelles au travers d'enregistrements de l'activité cérébrale ou la manipulation de cette activité par des agents pharmacologiques ou des méthodes d'optique.

Nous minimisons les contraintes liées à ce type d'études (chirurgies cérébrales vasculaires, hébergement individuel) en portant une attention particulière à la mise en pratique des principes éthiques fondamentaux (principe des 3R : Remplacement, Réduction, Raffinement).

#### Remplacement

Seul le modèle animal permet d'interroger les mécanismes neurobiologiques difficilement accessibles chez l'homme. De plus, l'étude du comportement addictif ne peut se réduire à la simple étude de l'effet de la drogue. Ce comportement met en jeu des mécanismes psychopharmacologiques complexes (conditionnement, perte de contrôle, impulsivité, compulsivité) qui ne peuvent pas être appréhendés par des modèles *ex vivo*.

Dans ce projet nous utiliserons un nombre total de 576 animaux, des rats non-consanguins, sur une période de cinq ans. Le rongeur est en effet utilisé depuis 1960 pour modéliser la prise de drogue au travers de la procédure d'auto-administration intraveineuse.

#### Réduction

L'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux est contraire à l'éthique, mais si trop peu d'animaux sont utilisés, l'expérience peut manquer de puissance statistique.

Deux approches peuvent être appliquées selon les conditions. Initialement, lorsque l'effet de la manipulation ne peut pas être anticipé, notamment dans les études manipulant l'activité cérébrale, nous ajustons le nombre d'animaux pour que le nombre final analysé soit de 10-12 animaux par groupe. Par la suite, lorsque nous disposons de suffisamment d'informations sur les variables de réponses, nous procédons à des analyses de puissance afin de déterminer le nombre adapté de sujets qui permettra d'affirmer que le résultat statistique obtenu est fiable.

#### Raffinement

Pour définir les dommages et contraintes subis par l'animal, nous avons établi une grille d'évaluation clinique et de surveillance. Pour réduire au maximum les conséquences de ces dommages, nous mettons en œuvre les moyens suivants : enrichissement de l'environnement, soins pré-, per- et post-opératoires, administration d'analgésiques, manipulation quotidienne après l'intervention chirurgicale, manipulation et examen bi-quotidiens avant et après la session comportementale, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt, phases d'habituation aux tests comportementaux.

L'état de santé et l'attitude générale des animaux seront donc évalués individuellement deux fois par jour. L'animal sera pesé une fois par semaine.

**9264** En Europe, la maladie hémorragique virale du lapin (RHD) est une maladie d'importance économique majeure pour la production de viande de lapin et une menace pour les populations de lapins de garenne, les lapins de compagnie et les écosystèmes naturels. C'est une maladie infectieuse fulgurante souvent fatale (60 à 90 % de mortalité en 48-72 heures). Les souches virales évoluent progressivement. De même, en 2010, un nouveau variant a été identifié. Cette évolution continue nécessite d'adapter les outils de laboratoire pour le diagnostic et la caractérisation des souches virales de RHD circulantes.

Grace à ce projet, de nouveaux réactifs seront produits. Ce sont des sérums immuns riches en anticorps. Ce type de réactif, selon la stratégie de développement envisagée, ne peut être obtenu que sur l'espèce animale cible - le lapin - impliquant le recours à l'expérimentation animale.

Le projet consiste à récupérer du sang de lapins qui auront développé une réponse immunitaire suite à une injection de particules pseudo-virales (particules non infectieuses contenant uniquement les protéines de la capsid du virus) avec un ou plusieurs rappels d'immunisation. Ce type de particule n'entraîne aucun signe clinique chez l'animal, il n'y a donc pas de raison que l'état de santé des lapins se dégrade. Cependant, un soin particulier sera apporté au suivi clinique de chaque animal au quotidien.

Afin d'éviter le stress de l'isolement et dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, chaque lot de particules pseudo-virales sera inoculé à deux lapins. Ces lapins seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation pour récolter un volume optimal de sang. Une estimation d'un besoin annuel de quatre nouveaux sérums vis-à-vis des virus de la RHD circulants entraîne la nécessité de l'utilisation de 40 lapins au maximum sur les 5 années de validité du projet.

**9265** Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde et sont responsables de plus de 8 millions de décès. En France, 385 000 cas sont diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes.

Ces trente dernières années, l'émergence de nouvelles technologies a permis de caractériser en profondeur les tumeurs, ainsi que leurs infiltrats immuns. La génération d'un environnement immunosuppresseur est le point de départ de l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire. Les immunothérapies sont conçues pour restaurer la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales par le propre système immunitaire du patient. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique.

Notre laboratoire développe un anticorps thérapeutique ciblant les récepteurs CD94/NKG2A qui sont à l'origine de l'inhibition des fonctions effectrices (cytotoxiques et production de cytokines) des lymphocytes T CD8 et Natural Killer (NK). En effet, des signaux inhibiteurs sont induits lorsque les récepteurs CD94/NKG2A interagissent avec leurs ligands (HLA-E chez l'homme et Qa-1b chez la souris) surexprimés par de nombreuses tumeurs. La stratégie thérapeutique développée par notre laboratoire réside dans le blocage de ces interactions par un anticorps, afin de réactiver les fonctions de ces cellules immunes, jouant un rôle crucial dans la reconnaissance et le rejet des cellules tumorales.

Dans ce contexte, afin de respecter la règle des 3 R :

-Remplacer et Réduire : le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux du blocage de NKG2A et de fournir des résultats statistiquement significatifs. Les données obtenues pour chaque paramètre sur des animaux traités pourront être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement placebo et/ou un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Le remplacement des animaux est impossible à mettre en place du fait de la nécessité d'étudier l'efficacité dans un modèle in vivo complexe, impossible à mimer in vitro.

-Raffiner : Afin de minimiser la douleur et le stress des animaux, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées, par l'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 5 maximum afin d'éviter le stress de l'isolement. De plus, les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale (gazeuse) et les volumes ainsi que les fréquences de prélèvement suivront les recommandations du CEPAL.

Le présent projet consiste à valider l'efficacité anti-tumorale du blocage du récepteur NKG2A. Les systèmes de régulation des cellules NK de l'homme et de la souris étant très proches, la souris représente le modèle animal le plus pertinent. Nous envisageons d'évaluer l'efficacité d'un anticorps reconnaissant les récepteurs NKG2A dans des souris sauvages porteuses de tumeurs exprimant Qa-1b. Nous planifions l'utilisation de deux lignées de souris sauvages : BALB/c et C57BL/6. Le projet s'articulera en plusieurs étapes :

-une première étape visant à évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser dans les étapes ultérieures d'efficacité les protocoles d'administration des anticorps.

-dans un second temps, l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps anti-NKG2A, seul ou en combinaison avec d'autres anticorps thérapeutiques ou avec des chimiothérapies sera évalué sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles de tumeurs seront utilisés : les cellules tumorales seront greffées soit par voie sous-cutanée, soit par voie intra-veineuse. Les points limites (fixés sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée) relatifs à la perte de poids, à l'apparence et aux volumes des tumeurs (nécrose, volume supérieur à 1800 mm<sup>3</sup>), à

l'apparence et à l'activité des animaux (prostration, poils piqués, isolement, difficultés respiratoires) sont des critères qui justifieront l'euthanasie des animaux.

Le nombre total d'animaux est évalué à 10496 sur 5 ans.

**9266** L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, qui affecte actuellement plus de 300 millions de personnes. À ce jour, nous manquons d'options pharmacologiques qui permettraient une prise en charge efficace de la majorité des patients obèses tout en limitant les contraintes et effets secondaires. Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel.

Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids. Plus précisément, cette régulation cérébrale s'effectue dans une structure située à la base du cerveau : l'hypothalamus. De nos jours, de plus en plus d'études démontrent que notre comportement alimentaire n'est pas simplement régulé par des signaux purement métaboliques, mais que les régions cérébrales impliquées dans le plaisir et la motivation sont également mises en cause. Ainsi, lorsque nous mangeons, les signaux relatifs à la fois au statut énergétique de notre organisme et l'état émotionnel et motivationnel doivent interagir afin de contrôler la prise alimentaire.

Notre projet vise à étudier les interactions anatomiques et fonctionnelles entre l'hypothalamus et les aires cérébrales du plaisir et de la motivation, et à comprendre comment ces circuits cérébraux sont affectés par un régime riche en calories.

Pour ce faire, nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant de manipuler spécifiquement l'activité de populations neuronales restreintes dans ces différentes régions cérébrales d'intérêt, et nous caractériserons l'activité neuronale de ces différentes populations grâce à des techniques d'enregistrements électrophysiologiques et le comportement alimentaire. Les données seront obtenues chez des souris soumises, ou non, à un régime riche en calories. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation de la prise alimentaire par ces différentes aires cérébrales.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 412 souris mâles adultes, car ce projet sera réalisé pendant 3 ans. Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. En plus, ce chiffre comprend le nombre d'animaux utilisés pour des études préliminaires (pilotes), afin de déterminer les doses optimales des composés qui seront testés dans nos expériences et mettre en place de nouvelles techniques, ce qui permettra de diminuer la quantité d'animaux utilisés à long terme. La souris représente un modèle de choix pour notre projet par la possibilité d'étudier des individus génétiquement modifiés et dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain pour que les informations obtenues soient pertinentes sur un plan médical. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions impliquent une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, que ce soit pour la régulation de l'appétit, de la glycémie (taux de sucre dans le sang) ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode in vitro ou in silico ne peut le remplacer. Enfin, en vue du raffinement des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Ainsi, les souris sont hébergées en cages collectives présentant un environnement enrichi, dans une pièce dédiée, avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. En outre, les cages, transparentes, sont rapprochées les unes des autres afin que chaque animal puisse avoir un contact visuel avec ses congénères. Avant les expériences, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux

**9267** La maladie à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer. Elle commence entre 50 et 85 ans et représente 20% des patients déments. Le nombre de patients MCL en France est estimé à environ 200000. Les

symptômes habituels de la MCL associent des troubles cognitifs comme des troubles de la mémoire, des troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), un syndrome parkinsonien - souvent discret en début de maladie- et des fluctuations attentionnelles. Au niveau cérébral, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats de protéines d'alpha-synucléine, formant ce que l'on appelle les corps de Lewy. On retrouve ces agrégats dans la maladie de Parkinson, sauf qu'ils sont localisés dans la substance noire, alors que dans la MCL, ils sont diffus dans l'ensemble du cerveau. Cependant, plusieurs études ont montré qu'une des premières structures impactées dans la MCL est le cortex insulaire appelé également insula. Cette atteinte serait responsable de certains troubles neurovégétatifs observés dans la maladie tels que la constipation, l'hypotension orthostatique, ou encore l'augmentation de la production de salive (hypersialorrhée).

Les conséquences comportementales d'un dysfonctionnement de l'insula sont à ce jour très peu décrites. C'est pourquoi, nous proposons de neutraliser les fonctions de l'insula chez la souris par injection d'une substance lésant les cellules (injection de N-méthyl-D-aspartate), soit dans la partie antérieure, soit dans la partie postérieure de cette structure. Les souris seront ensuite soumises à un ensemble de tests comportementaux afin d'évaluer l'impact de ces lésions sur la cognition, comme par exemple la capacité à retenir un goût (ce sens étant particulièrement dépendant de l'insula), le stress, ou encore l'activité locomotrice.

Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous devons faire des essais de lésions et qu'ensuite nous travaillerons avec un groupe de souris lésées et un groupe contrôle, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 74 souris. Afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début des tests comportementaux. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation comportementale. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage, de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction). Les tests comportementaux étant stressant pour les animaux, ceux-ci seront observés quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse ou tout changement de comportement important (prostration, convulsions, isolement, absence de toilettage, présence de plaies, posture voutée, perte de poids). En cas d'anomalies, un entretien entre le responsable du projet et le responsable du bien-être animal sera effectué afin de prendre une décision concernant le devenir des animaux (euthanasie ou non avant la fin de l'expérience). Les conditions d'expérience sont telles que l'apparition de tels signes de détresse ou changements comportementaux ne devrait se produire qu'à titre exceptionnel.

**9268** Ces travaux pratiques s'intègrent dans un enseignement de Biochimie en troisième année de la Licence de Biologie. Ils illustrent la régulation du métabolisme biochimique dans différentes conditions physiologiques. Le but des travaux pratiques est de déterminer la concentration de divers paramètres sanguins du métabolisme lipidique et glucidique à partir d'animaux à des états nutritionnels différents. Lors de ces TP, nous voulons mettre en évidence les effets éventuels de la composition de l'aliment (aliment normal vs aliment gras) sur certains paramètres biochimiques du plasma, et également comparer les effets des différents états nutritionnels (2h après prise alimentaire, 6h après prise alimentaire, ou après 24h de jeûne).

Le sang proviendra de souris hébergées dans une animalerie agréée de l'Université, et les souris utilisées seront des animaux de réforme pour cette animalerie, (c'est à dire des animaux destinés à être euthanasiés), par conséquent ils n'auront pas été produits spécialement pour ces TP. L'utilisation de plus gros animaux n'est pas envisageable par faute de disponibilité dans l'animalerie du campus. La lignée, le sexe et l'âge sont totalement indifférents. Cette étude est une procédure terminale pour l'animal, qui ne se réveillera pas.

Pour chaque condition, le sang d'un lot de souris sera prélevé par le personnel agréé de l'animalerie par ponction intra-cardiaque terminale, sur animal profondément anesthésié et sous analgésie.

Chaque tube de sang sera ensuite centrifugé en présence d'anti-coagulant en vue d'obtenir le plasma qui sera congelé pour une utilisation ultérieure par les étudiants lors des TPs : dosages de la concentration en glucose, en triglycérides, en cholestérol et en protéines.

Pour chaque TP, nous aurons besoin de 4 lots de 8 mL de sang, ce qui représente 10 souris par lot afin de recueillir un volume plasmatique suffisant. Au total 4 lots x 10 souris = 40 animaux par TP, soit sur 5 ans  $40 \times 5 = 200$  souris.

Les souris utilisées sont élevées selon les recommandations éthiques en appliquant la règle des 3R :  
- Ce type d'enseignement est indispensable aux étudiants afin de comprendre le métabolisme biochimique d'un organisme vivant et ne peut être remplacé par des pratiques in vitro. En effet, le but et la richesse des travaux pratiques à l'Université est de permettre à l'étudiant de manipuler dans des conditions expérimentales et non pas être restreint à des expériences « virtuelles ». Des enseignements théoriques de ce type sont déjà mis en place dans cette unité d'enseignement au cours des Travaux Dirigés (TD) en utilisant des exemples concrets de régulation biochimique des différents métabolismes extraits de la bibliographie et également dans des Travaux sur Machine (TDM) à l'aide de l'informatique pour analyser les résultats pratiques obtenus. L'utilisation de sérum ou plasma commercialisé a été envisagée, mais à défaut de ne pas trouver des échantillons illustrant une régulation nutritionnelle des paramètres biochimiques, ce qui est un des objectifs principaux de cet enseignement de biochimie intégrative, nous ne pouvons qu'envisager une production d'échantillons spécifique à cette problématique par nos propres moyens.

- Les étudiants travaillent en binôme afin de réduire au maximum le volume de sang utilisé et donc le nombre d'animaux euthanasiés, qui sont de plus des animaux de réforme. Aussi, la nouvelle technique de dosage utilisée (microplaque) réduit considérablement le volume de sang nécessaire (200 µL par puit au lieu de 1 mL avec un kit classique), par conséquent le nombre d'animaux utilisés.

- Les souris sont hébergées en animalerie agréée et élevées par du personnel qualifié qui veille à leur bien-être quotidien, weekend compris. De plus, leur environnement est enrichi par des jouets (tunnels en polycarbonate) et elles vivent en fratrie. Enfin, un analgésique morphinique sera utilisé pour supprimer leur douleur pendant la ponction intra-cardiaque sans réveil.

**9269** La schizophrénie est une maladie psychiatrique qui affecte environ 1% de la population mondiale. Cette pathologie se caractérise par des symptômes dits positifs notamment caractérisés par des hallucinations et des symptômes dits négatifs caractérisés par un manque de motivation. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif, mais les neuroleptiques traitent ces symptômes. Cette pathologie se révèle être plus complexe, ainsi il existe aussi des symptômes cognitifs, dont une diminution de l'attention, des troubles de la mémoire ou encore des altérations des interactions sociales. Ces déficits cognitifs sont un lourd handicap à l'intégration sociale et professionnelle des patients et impactent donc gravement leur qualité de vie. Ces symptômes particuliers ne sont pas traités par les neuroleptiques. Ce projet vise donc à mieux comprendre des mécanismes sous-jacents à ces symptômes et l'identification de cibles potentielles.

Parmi ces cibles, nous porterons un intérêt particulier au récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine (neurotransmetteur). L'activation de ce récepteur active notamment une voie de signalisation intracellulaire qui implique une protéine particulière : mTOR. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ainsi que mTOR ont en effet été mis en cause dans les déficits cognitifs notamment dans des modèles développementaux murins de schizophrénie. Pour ce projet deux modèles de schizophrénie seront utilisés un modèle pharmacologique et un modèle génétique. Le modèle pharmacologique consiste en une administration d'une molécule, le PCP, chez des souris très jeunes. Le modèle génétique correspond à des souris mutantes (DISC-1 L100). Dans chacun de ces modèles nous évaluerons au cours du temps les variations de neurotransmissions dans le cortex médian préfrontal, zone cérébrale largement impliquée dans nombre de pathologies psychiatriques. Ceci permettra d'évaluer l'effet d'un traitement par un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou d'un inhibiteur de la voie mTOR en préventif (pendant la période correspondant à l'adolescence de la souris) ou en curatif (à l'âge adulte). La technique de microdialyse intracérébrale permettra de mesurer les concentrations en différents neurotransmetteurs au cours du temps chez les mêmes animaux.

Pour l'ensemble de ce projet, 450 animaux seront utilisés. Ce nombre prend en compte la règle des 3R. Il s'agit de remplacer si possible l'expérimentation animale, à défaut de réduire le nombre

d'animaux et de raffiner la qualité des expériences. Les inter-régulations fines qui existent entre les différentes structures cérébrales impliquent leur étude sur animaux vivants. L'ensemble du projet aura à cœur de conserver les animaux dans un état de confort optimal et pour ce faire des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire. Notre expérience se basera sur la microdialyse chronique ou chaque animal sera utilisé comme son propre témoin. Ceci présente l'avantage de générer une quantité de données importante pour chaque animal, et en limite ainsi le nombre. Un anesthésique (hydrate de chloral) est utilisé pour effectuer l'implantation des sondes de microdialyse. Le cerveau étant un organe dépourvu de fibres nerveuses libres dédiées à la nociception, bien qu'invasive cette chirurgie se révèle mineure pour les animaux.

Ce travail permettra une compréhension plus approfondie du rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de la voie mTOR dans les troubles cognitifs liés à la schizophrénie. Le rôle préventif des molécules testées est crucial car il permettrait d'éviter le développement des symptômes de la schizophrénie chez des sujets à risques dont les troubles cognitifs pourraient être les précurseurs.

**9270** L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet du fractionnement de la radiothérapie (RT), c'est-à-dire le nombre de séances d'irradiation, délivrée par des protons sur la croissance tumorale, l'implication des mécanismes de réparations des dommages de l'ADN et l'efficacité sur la réponse immunitaire antitumorale.

Le but de cette étude est de démontrer que la modulation de la dose par séance et du nombre de séances, à savoir une fraction versus trois fractions, peuvent induire des effets différents avec des équivalences de doses totales biologiques.

Contrairement à la radiothérapie standard par photon, la protonthérapie permet de délivrer la dose prescrite dans la tumeur, tout en préservant les organes avoisinants. Les organes de proximité ne sont donc pas irradiés et le risque de complications est largement réduit. Par ailleurs, l'efficacité des protons est de 10% supérieure à celle des photons pour une même dose d'irradiation.

La première partie de l'étude évaluant l'efficacité des traitements en termes de retard de croissance tumorale nécessitera 108 souris. Pour la seconde partie, 252 souris seront nécessaires à l'étude cinétique permettant d'évaluer l'effet des traitements sur l'efficacité des mécanismes de réparation et sur l'induction de la réponse immunitaire antitumorale. Au total, 360 animaux seront nécessaires afin d'obtenir des résultats fiables.

Réduction : Pour chaque expérience, 3 groupes de souris, un contrôle et 2 groupes de traitement, seront évalués. L'évaluation des traitements sur la croissance tumorale sera effectuée avec des groupes de 15 souris et l'analyse biologique sera réalisée à différents points de cinétique avec des groupes de 7 souris. Les effectifs sont justifiés par l'importante variabilité des résultats obtenus sur l'étude du système immunitaire dans l'efficacité du traitement.

Raffinement : Les souris seront observées et la croissance des tumeurs sera mesurée trois fois par semaine et les données seront intégrées à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc.) et pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec euthanasie des souris dès lors qu'un point limite sera atteint. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux. Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement conformes à la validation de la cellule bien-être.

Remplacement : seule une étude sur des modèles animaux permettra d'analyser l'effet des modalités d'administration de la RT sur la réponse immunitaire.

Les résultats finaux obtenus permettront de fixer le schéma d'administration de RT par protons le plus efficace en terme d'effet direct sur la tumeur, mais aussi propice à l'association de la RT avec des immunothérapies qui sont actuellement évaluées dans de nombreux essais et dont les effets sont prometteurs.

**9271** Mots clés : veaux, bovins, modèle expérimental, diarrhée du veau, colibacillose, Escherichia coli  
- Raison du projet : La diarrhée du veau est une pathologie fréquente en élevage bovin dans les semaines qui suivent la naissance. Plusieurs agents infectieux, dont des bactéries, des virus et des

protozoaires, peuvent être à l'origine de diarrhée chez le veau. La bactérie la plus couramment rencontrée dans la diarrhée du veau est *E. coli*, et plus particulièrement les souches entéropathogènes F5 et CS31A. Les veaux présentent une diarrhée aqueuse jaune grisâtre, parfois striée de sang, suivie d'une déshydratation pouvant conduire à la mort rapide de l'animal. Les pertes liquidiennes provoquées par la diarrhée conduisent à un état de désordre électrolytique qui amplifie l'effet délétère de la déshydratation sur le comportement de l'animal (absence de réflexe de succion par exemple). L'évaluation de l'efficacité des médicaments vétérinaires pour lutter contre les agents infectieux responsables de la diarrhée, ou pour corriger la déshydratation et des troubles associés est donc importante.

- Objectif du projet : Reproduire expérimentalement une diarrhée induite par *E. coli* chez le veau pré-ruminant dans le but d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de médicaments vétérinaires ou d'autres produits à usage pharmaceutique (additifs, biocides ou produits phytopharmaceutiques par exemple) sur animal malade.

- Animaux : Ce modèle est développé chez le veau entre une et trois semaines d'âge, période qui correspond à l'épidémiologie de la pathologie sur le terrain. Le sexe n'a pas d'importance. Le nombre d'animaux nécessaire sera calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec une puissance statistique adéquate (0.8 en général). Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera compris entre 4 et 12, soit un effectif maximum de 60 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 1, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 300 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : En l'absence de traitement adéquat, la diarrhée provoque chez le jeune veau non ruminant une déshydratation rapide, des désordres électrolytiques, un abattement de l'animal pouvant aboutir à la mort dans les cas les plus graves. La souffrance attendue est donc considérée comme sévère.

- Application des 3Rs :

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

. Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. Raffinement : l'hébergement sera adapté aux besoins physiologiques des animaux et permettra l'expression de leur gamme normale de comportements. La contention visera à minimiser le stress et le bien-être sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux.

**9272** L'épilepsie est une maladie neurologique répandue dans le monde. Les personnes touchées déclenchent des crises d'épilepsie plus ou moins récurrentes et sévères selon les cas. Ces crises endommagent le système nerveux central qui devient alors de plus en plus sensible au déclenchement d'autres crises. A l'échelle du réseau neuronal, une crise traduit un déséquilibre de la balance régulant l'excitation et l'inhibition, en faveur de l'excitation. Les conséquences observées lors de ces déséquilibres traduisent l'importance de maintenir un parfait équilibre excitateur et inhibiteur dans le système nerveux central et de comprendre leur fonctionnement moléculaire et cellulaire précis.

Au début des années 2000, une mutation dans le gène codant pour une protéine appelée leucin-rich glioma-inactivated 1 (LGI1) est identifiée comme la cause d'une forme héréditaire d'épilepsie du lobe temporal. La protéine LGI1 est exprimée dans le système nerveux central au niveau de l'hippocampe, une structure impliquée dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage. Cette découverte ouvre la porte à une série d'étude visant à comprendre le fonctionnement du réseau neuronal. Ces études ont permis de montrer que LGI1 est une molécule essentielle au développement du système nerveux central et à la régulation fine de la balance entre l'excitation et l'inhibition dans le cerveau adulte. Cependant les approches actuelles ne permettent pas de comprendre les fonctions de LGI1 dans la transmission synaptique dans un réseau neuronal mature car il est difficile de les dissocier des perturbations développementales.

En 2010, des anticorps dirigés contre la protéine LGI1 sont trouvés dans le sérum et/ou liquide céphalorachidien (LCR) de patients souffrants d'encéphalite limbique, une inflammation du système

nerveux central. De manière cohérente avec les patients épileptiques ayant une mutation dans le gène *Lgi1*, les patients avec une encéphalite limbique déclenchent de fréquentes crises d'épilepsie. Cette découverte d'anticorps produit par les patients constitue alors une alternative innovante dans l'étude du rôle de la protéine LGI1 dans la transmission synaptique. En effet, grâce à ces anticorps anti-LGI1 pathogènes, il est alors possible d'induire un blocage de la fonction de LGI1 lorsque le réseau neuronal est mature.

Notre projet consiste à étudier le rôle de la protéine LGI1 dans la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe mature. Pour cela, nous réaliserons une étude électrophysiologique et biochimique sur des cultures cellulaires et sur tranches d'hippocampe de souris préalablement infusées avec des anticorps de patients. Une étude biochimique sur culture cellulaire complètera notre projet. Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en enrichissant leur environnement et en leur fournissant des analgésiques adaptés lors des soins post opératoires (Raffinement). Nous limiterons le nombre de souris (n=236) au maximum en réalisant des expériences en culture cellulaire (Remplacement) et sur tranche afin de réduire le nombre de souris soumis au traitement avec les anticorps de patients (Réduire). L'ensemble de ces expériences permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires des encéphalites auto-immunes et d'une façon plus générale les mécanismes physiopathologiques impliquant la protéine LGI1

**9273** La morphine est l'antalgique majeur de référence de la famille des opioïdes. Elle possède des effets indésirables notoires comme l'accoutumance et la dépression respiratoire. Notre organisme produit des substances de la même famille des opioïdes nommées enképhalines. Ces enképhalines qui possèdent également des propriétés antalgiques sont rapidement dégradées par des enzymes, les enképhalinasés, ce qui limite leur pouvoir analgésique. On a découvert il y a quelques années certaines molécules qui bloquent ces enképhalinasés, C'est pourquoi, ces nouvelles molécules qui agissent en inhibant la dégradation de ces enképhalines sont à l'étude car non seulement elles prolongent les propriétés analgésiques des enképhalines mais sans les effets indésirables de la morphine, ce qui constituerait un progrès très important. Les nouvelles molécules en question ont récemment montré leur efficacité sur la douleur aiguë ce qui représente un véritable enjeu de santé publique. Le but du présent projet consiste à étudier et caractériser les mécanismes d'action de la molécule la plus prometteuse pour en préciser les conditions d'utilisation. En effet, il existe différents types de douleur (douleur mécanique, inflammatoire, neuropathique, cancéreuse,..) qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques et qui réagissent spécifiquement aux différentes familles de médicaments antalgiques.

Dans une première partie, nous procéderons ainsi à des études immunohistochimiques et à des injections d'antagonistes spécifiques afin de caractériser les mécanismes impliqués dans l'effet antalgique de la substance étudiée. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre de mieux anticiper ses modalités d'utilisation chez l'homme et d'appréhender d'éventuels effets secondaires. Nous utiliserons un modèle de douleur aiguë postopératoire bien validé chez le rat dans les études sur la douleur. Ce modèle est caractérisé par la réalisation d'une incision plantaire sous anesthésie générale. Cette incision correspond chez l'homme à la douleur légère d'une suture très superficielle ayant nécessité quelques 3 à 4 points de suture.

Dans une deuxième partie, nous chercherons à caractériser le pouvoir analgésique de la substance dans le cadre de la douleur neuropathique (d'origine nerveuse) lorsque cette substance est administrée avec le médicament de référence utilisé pour ce type de douleur. Il s'agit d'une étude de synergie permettant de savoir s'il y a un intérêt à administrer ces deux substances chez l'homme pour en accroître le pouvoir analgésique. Ceci serait prometteur car le traitement de la douleur neuropathique présente actuellement de nombreux échecs.

Le modèle de douleur neuropathique (douleur liée à une lésion nerveuse) que nous utiliserons est caractérisé par une ligature des racines nerveuses L5 et L6 sous anesthésie générale. Ce modèle correspond chez l'homme à une douleur de type sciatique chronique.

Enfin, dans une troisième partie, nous évalueront le pouvoir antalgique de la molécule étudiée dans le cadre de la douleur cancéreuse. La douleur osseuse cancéreuse est une des plus difficile à traiter et fait appel assez rapidement à la morphine et à ses dérivés qui présentent rapidement de lourds



effets secondaires. Le modèle de douleur cancéreuse choisi est le modèle d'injection de cellules cancéreuses dans le tibia. Cette procédure se réalise sous anesthésie générale. La croissance de la tumeur entraîne une douleur de la patte conduisant l'animal à répartir son poids différemment entre ses deux pattes. Cette différence de répartition du poids est analysée par une plate-forme munie de capteurs.

Les tests pour caractériser la douleur qui seront utilisés sont :

1) Les filaments de Von Frey : différents filaments en plexiglas de diamètre croissant sont appuyés sur la zone cutanée sensée être douloureuse jusqu'à obtenir un retrait de la patte du rat (la douleur provoquée est très légère puisque le test est arrêté pour la pression la plus faible ayant entraîné le retrait de la patte). Pour ce test un point-limite est déterminé afin de ne pas exercer une pression trop importante chez l'animal qu'il ne ressentirait pas mais qui pourrait léser sa peau.

2) Test à la chaleur : Le test à la chaleur consiste à diriger un rayon infrarouge sur la zone sensée être douloureuse jusqu'à obtenir le retrait de la patte. Le seuil douloureux de base est caractérisé par le temps d'exposition à la chaleur (en secondes) entraînant le retrait de la patte; il est comparé au seuil douloureux observé avec le médicament. Pour ce test un point-limite est également déterminé afin de ne pas exercer une chaleur trop importante chez l'animal qu'il ne ressentirait pas mais qui pourrait léser sa peau.

3) Le test d'analyse de la répartition du poids entre les deux pattes est passif et donc sans conséquence sur l'animal.

L'administration du produit ou du Véhicule se fera toujours par un dispositif d'injection continue intraveineuse implanté sous la peau, ceci étant réalisé sous anesthésie générale.

Dans une perspective de remplacement, nous avons auparavant effectué des expérimentations in-vitro qui ont montré l'efficacité de la molécule choisie. Il est cependant nécessaire de faire des expérimentations chez l'animal avant le passage à l'homme. Dans une perspective de réduction, nous avons calculé le nombre d'animaux au plus juste en utilisant les méthodes statistiques les plus efficaces (calcul de puissance entre autres). De plus, nous avons essayé autant que faire se peut, de faire le plus d'expérimentations au sein d'une même procédure, ceci sans soumettre les animaux à un stress supplémentaire. C'est pourquoi, nous avons aussi attaché une grande importance au raffinement : les expériences sur la douleur nécessitent que les animaux ne subissent pas un stress supplémentaire, aussi les conditions d'hébergement seront adaptées au mieux (groupes de plusieurs animaux par cage, acclimatation avec le même expérimentateur 10 jours avant les tests, enrichissement des cages...) et la durée des expériences réduite au strict nécessaire. La surveillance des animaux sera rapprochée et des points limites spécifiques sont prévus pour tous les tests comme indiqués ci-dessus.

Le nombre de rats nécessaire est de 181

**9274** Le cancer du sein est le plus courant des cancers et une cause importante de décès chez les femmes à travers le monde. La mortalité associée à ce type de cancer est majoritairement due à la formation de métastases dans les organes périphériques. Il est donc important de continuer à comprendre comment les métastases se forment à partir des tumeurs primaires mammaires pour définir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'en empêcher la formation.

Nous essayons de comprendre si un stress lié à l'altération du rythme jour/nuit peut influencer sur l'apparition et le réveil des cellules souches cancéreuses. Il existe en effet dans chaque organisme une horloge moléculaire, régulée par le cerveau, capable d'adapter l'activité de nos organes et notre métabolisme à cette alternance des jours et des nuits. Des altérations de cette horloge moléculaire, notamment chez les personnes travaillant au quart comme les infirmières et certains ouvriers, sont corrélées à l'apparition de lésions cancéreuses mais pourraient aussi avoir un rôle sur l'apparition des cellules souches cancéreuses et sur leur aptitude à former des métastases.

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

Suite à ces études in vitro, nous voulons confirmer nos résultats chez l'animal, en provoquant un stress circadien réel par l'utilisation de jetlags répétés. Nous utiliserons une lignée de souris transgénique développant spontanément des tumeurs mammaires (MMTV-PyMT) en présence ou absence de mutation pour le gène *Per2*, un facteur régulant l'horloge circadienne. Au début de l'expérimentation, les souris seront soumises soit à une alternance jour/nuit normale (12h pour chaque période) soit à une alternance jour/nuit variable (jetlag) pour une durée définie.

Nous évaluerons à la fin de l'expérimentation l'effet de ce stress circadien sur la progression tumorale en quantifiant le nombre de tumeurs primaires et de métastases pulmonaires. Nous voulons aussi évaluer si ce stress, en lien avec les mutations, affectent la proportion de cellules souches cancéreuses disséminées dans l'animal.

Notre projet prend en considération la règle des 3Rs :

**Remplacer** : La majeure partie de nos expérimentations sont réalisées in vitro sur des cultures cellulaires. Cependant la reproduction d'un stress circadien et de ses répercussions sur l'organisme ne peut pas être réalisée in vitro, tout comme le contexte biologique de la progression tumorale. Le recours à l'animal est donc encore nécessaire pour évaluer l'effet d'un stress circadien sur la progression tumorale.

**Réduire** : nous avons défini nos plans d'expériences afin d'avoir un nombre d'animaux par lot permettant de réaliser des analyses statistiques discriminantes entre lots contrôles et lot expérimentaux. Le nombre total d'animaux nécessaire pour cette expérimentation est de 270 souris.

**Raffiner** : les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée et manipulés par des personnes formées. Les cages comprendront des éléments pour enrichir l'environnement des animaux et leur permettre de reproduire des comportements naturels (exploration, fouissement, nidification). Les animaux seront visités quotidiennement afin d'évaluer leur état de santé et leur comportement. Un traitement analgésique par injection sera appliqué à l'apparition des symptômes suivants : perte d'appétit, poil hérissé et terne, problème de motricité. Nous utiliserons le système d'imagerie non invasif IVIS pour suivre la progression tumorale avec précision et avec un minimum de manipulation et de gêne pour les animaux. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation ou lorsque l'un des points limites définis dans le projet sera franchi.

**9275** Le syndrome des yeux secs ou kérato-conjonctivite sèche est une maladie provoquée par une production insuffisante ou une mauvaise qualité du liquide lacrymal, qui touche un nombre croissant de patients âgés de plus de 40 ans. Ce syndrome augmente les risques d'infections et d'inflammations oculaires et donc de conjonctivite. Il peut provoquer à terme des ulcères de la cornée. Il n'existe pas de traitement idéal et les praticiens prescrivent l'instillation de sérum physiologique ou de collyres. Des études qui visent à reproduire le liquide lacrymal sont en cours pour améliorer le confort et traiter les yeux de ces patients par l'ajout de molécules destinées à lubrifier l'œil pour qu'il reste hydraté et le protéger des infections.

Le but de ce projet est d'étudier la tolérance et l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements, visant la restauration des fonctions des glandes lacrymales et la régénération de la cornée de l'œil, dans un modèle pathologique de l'œil mimant le syndrome des yeux secs chez la souris et le rat. Une vingtaine de molécules ont été sélectionnées à la suite de tests in vitro sur différentes lignées cellulaires de l'œil. Afin de transposer l'application de ces molécules chez l'homme, il est indispensable d'évaluer l'efficacité de ces dernières dans un système physiologique animal.

Les rongeurs possèdent une anatomie oculaire assez similaire à celle de l'homme, ce qui en fait l'un des modèles expérimentaux les plus fréquemment utilisés en recherche ophtalmologique. La conjonctivite est induite expérimentalement par administration d'un collyre irritant approprié (atropine de sulfate 1%) durant 7 jours en application locale.

Le projet sera réalisé sur deux espèces différentes de rongeurs (rat et souris) et se décomposera en deux parties. Il nécessitera 732 souris et 732 rats pour tester 20 molécules sur 5 ans à raison de 4 molécules par an.

Dans un premier temps, une expérience pilote sera réalisée sur 4 groupes de souris et 4 groupes de rats ( $n = 3$  / groupe) traités ou non avec une molécule thérapeutique (dose faible), avec ou sans anesthésie gazeuse pendant l'administration du traitement par voie oculaire. Cette expérience préliminaire nous permettra de vérifier la faisabilité de l'application des traitements avec ou sans

anesthésie des animaux. Ensuite, des tests de tolérance seront réalisés sur un lot de 12 souris et 12 rats par molécule testée répartis en 4 groupes à raison de (3 souris / 3 rats) par groupe : 3 groupes pour 3 doses croissantes et un groupe contrôle qui recevra le véhicule. Ces tests nous permettront d'avoir deux réponses complémentaires sur deux espèces différentes avec un minimum d'animaux utilisés. Nous prévoyons de tester 4 molécules par an sur la durée du projet de 5 ans. Ainsi, les tests de tolérance nécessiteront 240 souris (3 souris \* 4 groupes \* 4 molécules \* 5 ans) et 240 rats (3 rats \* 4 groupes \* 4 molécules \* 5 ans). Cette analyse permettra de fixer la dose non toxique la plus appropriée pour réaliser des traitements locaux sur notre modèle induit de conjonctivite / « yeux secs ». Avec 12 souris et 12 rats pour l'expérience pilote, cette première partie nécessitera 252 souris et 252 rats.

Dans un second temps, l'efficacité thérapeutique de chacune des molécules d'intérêt sera évaluée sur le modèle de conjonctivite chez la souris et le rat. Par molécule, elle nécessitera 24 souris et 24 rats répartis en 3 groupes expérimentaux (1 groupe véhicule + 1 groupe traité avec la molécule d'essai à la dose tolérée déterminée lors du test de tolérance + 1 groupe de contrôle positif avec un traitement de référence). A raison de 4 molécules testées par an, l'étude d'efficacité nécessitera 480 souris et 480 rats sur 5 ans.

Au final, le nombre total d'animaux nécessaires pour ce projet est estimé à 732 souris et 732 rats pour une période de 5 ans.

Le traitement sera administré uniquement par voie locale. Il sera suivi par des examens associés à des signes cliniques (rougeur, larmolement, paupières enflées, sensibilité à la lumière...), un bilan sanguin sera pratiqué ainsi que des analyses histologiques seront réalisées sur les yeux prélevés après euthanasie de l'animal.

Dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expérience et d'animaux nécessaires. Dans cette optique, le test de tolérance nous permettra de déterminer une seule dose non toxique (tolérée) à utiliser par la suite, ce qui favorisera la réduction du nombre d'animaux utilisés lors des tests d'efficacité. Ainsi, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal puisqu'aucune autre méthode de remplacement in vitro n'existe actuellement.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, l'expérience pilote à réaliser au préalable nous permettra d'évaluer la pertinence d'une anesthésie gazeuse lors des applications des instillations oculaires. Des points limites ont été établis ; ils entraîneront l'arrêt anticipé de la procédure et l'application de soins antalgiques, avec l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être. L'intégrité oculaire et les différents paramètres cliniques attestant du bien-être physique et psychologique des animaux seront vérifiés quotidiennement.

Ce projet permettra d'apporter une preuve de concept préclinique sur l'efficacité de nouvelles molécules sélectionnées pour le traitement des conjonctivites et le syndrome des yeux secs.

**9276** La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune complexe caractérisée par une atteinte vasculaire, inflammatoire et dysimmunitaire ainsi qu'une fibrose tissulaire. Les patients atteints de ScS ont un risque de décès multiplié par 3,5 par rapport à une population saine appariée. La fibrose pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire constituent les deux principales causes de décès dans cette maladie.

A ce jour, malgré les progrès récents dans les connaissances de la physiopathologie de la maladie, il n'existe pas de traitement permettant de traiter efficacement les complications vasculaires et la fibrose liées à la ScS.

Notre objectif est de valider le rôle fonctionnel de 3 différents acteurs de la fibrose et de l'inflammation, en utilisant des agents thérapeutiques, dans deux modèles murins de fibrose dermique induite chimiquement.

Aucun modèle animal ne reproduit entièrement la physiopathologie complexe de la ScS, c'est pourquoi l'utilisation de deux modèles murins complémentaires est nécessaire pour évaluer l'implication de ces 3 cibles.

Il n'existe pas d'autre alternative pré-clinique d'évaluation de ces molécules prometteuses.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 192 souris sauvages et génétiquement modifiées.

Nous évaluerons les conséquences de la modulation de ces cibles sur le développement de l'inflammation et de la fibrose à l'aide de paramètres cliniques et d'histologie.

Un suivi très précis avec une évaluation de la douleur est mis en place pour éviter toute souffrance inutile des animaux, des points-limites ont été établis avec une grille d'évaluation de la douleur qui a été développée spécifiquement pour ce type d'étude. Un score de douleur trop élevé implique l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant des comparaisons statistiques cohérentes.

Ce travail devrait permettre de mieux préciser la physiopathologie de la ScS, avec pour objectif de développer de nouvelles stratégies antifibrosantes.

**9277** Dans un contexte de crise agricole, la sélection génétique des bovins est reconnue comme étant un levier majeur de compétitivité et de durabilité des élevages notamment face aux demandes sociétales sur le « produire mieux » (diminution de l'impact environnemental, respect du bien-être animal, produits de qualité...). Afin de répondre au plus vite à ces enjeux, il est nécessaire de réduire l'intervalle de génération dans le cadre des schémas de sélection de manière à apporter le plus rapidement possible le progrès génétique dans les élevages. L'utilisation des techniques de transfert embryonnaire (production d'embryons à partir d'une femelle donneuse d'intérêt et transfert dans des femelles receveuses de moindre valeur génétique) et l'utilisation d'animaux jeunes sont deux facteurs clés pour la réduction de cet intervalle chez une espèce pour laquelle le temps de génération est un facteur limitant. La production d'embryons n'étant efficace que chez les animaux sexuellement matures, les professionnels s'intéressent de plus en plus aux mécanismes gouvernant la puberté. L'apparition de celle-ci étant fortement liée au développement corporel des animaux, des études antérieures ont montré qu'il était possible d'avancer significativement l'âge à la première ovulation des génisses en optimisant leur nutrition pendant des étapes clés de leur croissance prépubertaire. Toutefois, les limites biologiques sont encore inconnues de même que la capacité de ces génisses précoces à produire des embryons de bonne qualité pour les besoins des schémas de sélection. Lors d'une récente étude en race Holstein, nous avons pu démontrer qu'une conduite optimisée de l'alimentation permettait d'obtenir une puberté plus précoce sans dégrader leur capacité à produire des embryons. Cependant les résultats obtenus n'ont pas permis d'atteindre les objectifs de croissance théoriques (problèmes rencontrés lors de l'étude à des points clés de la croissance des jeunes génisses). Le projet présenté a donc pour objectif de mener un programme de recherche en race Montbéliarde avec les mêmes objectifs de réduction de l'intervalle entre générations. Le but de cette étude sera de déterminer la conduite alimentaire optimale dans cette race en comparant deux conduites alimentaires différentes sur la phase pré-pubertaire (2 lots de 10 génisses) et en déterminant celle qui permettra d'obtenir les meilleurs résultats de croissance, d'âge à la puberté et de production d'embryons. Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3 R. Remplacement : aucun modèle ex vivo n'étant à ce jour disponible concernant l'étude de la relation croissance des animaux, âge à la puberté et performances de reproduction, le recours à l'animal est nécessaire. Réduction : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés pour garantir une approche statistiquement valable tout en conservant un minimum de variabilité individuelle. Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant à la notion de bien-être animal chez cette espèce (accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales.).

**9278** La mémoire de travail, est une mémoire qui nous permet de disposer d'un espace de travail mental afin de maintenir et utiliser des informations pendant une période de plusieurs secondes, voire plus longtemps. Chez l'Homme comme chez l'animal, cet espace de travail mental est sous-tendu par des aires cérébrales comme le cortex préfrontal médian (CPFm) et l'hippocampe (Hipp). Les interactions entre ces deux structures cérébrales sont essentielles dans différents processus neurobiologiques liés à la mémoire, mais pourtant, au niveau anatomique, ces deux structures cérébrales ne sont pas si bien interconnectées. Il semblerait que d'autres structures interviennent dans le dialogue entre le CPFm et l'Hipp et modulent les informations échangées, nécessaires à la mémorisation. Les noyaux

Reuniens et Rhomboïde (ReRh) de la ligne médiane du Thalamus sont directement et réciproquement connectés, à la fois au CPFm et à l'Hipp. Ces noyaux thalamiques sont donc particulièrement bien placés pour assurer la communication neuronale nécessaire à la mémoire de travail. L'hippocampe est largement reconnu pour son rôle dans le traitement des informations spatiales : chez l'homme comme chez l'animal. La mémoire de travail spatiale confère à l'individu la capacité d'adaptation de son comportement aux contraintes immédiates de l'environnement. Chez le rongeur, tel que le Rat, cette capacité est très bien développée et il est considéré comme un très bon modèle d'étude des bases neurales de cette mémoire spatiale de travail.

Le but de ce projet est de mettre en évidence l'importance des noyaux ReRh au sein d'un réseau hippocampo-cortico-thalamique dans la mémoire de travail spatiale. Pour cela nous allons i) utiliser l'imagerie cérébrale du gène précoce c-fos pour visualiser les régions actives au cours du processus étudié, puis ii) inhiber temporairement l'activité des neurones des noyaux ReRh, de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian lors d'une tâche de mémoire de travail spatiale. Cette approche inclura aussi des inactivations croisées de l'hippocampe et du CPFm en unilatérale, soit Hipp droit et CPFm gauche et vice et versa. Les animaux utilisés seront des rats mâles de souche Long Evans, âgés de 2,5 mois en début d'expérience, pour un total de 268 rats pour les 5 ans du projet.

Ce projet respectera au mieux la règle des 3 R :

- Réduction : Nous utiliserons seulement le nombre d'animaux nécessaire pour que les résultats soient valides d'un point de vue statistique. D'autre part, pour les tâches comportementales (procédures légères), les mêmes animaux pourront être réutilisés. Cette mesure aura pour effet de réduire le nombre total d'animaux mais aussi de remanipuler les mêmes individus, largement habitués et réceptifs à l'expérimentateur.

- Raffinement : Les rats, animaux grégaires, seront hébergés par trois afin d'éviter le stress provoqué par l'isolement et auront un bâtonnet à ronger. Les procédures chirurgicales nécessaires pour permettre les inactivations des structures cérébrales seront réalisées sous anesthésie générale profonde avec des soins anti-inflammatoires avant, pendant et après la chirurgie. Les animaux opérés seront soigneusement surveillés pendant les jours qui suivent la chirurgie. Dès leur entrée dans la procédure expérimentale, ils seront manipulés tous les jours par un nombre restreint d'expérimentateurs, ce qui permet d'augmenter la qualité relationnelle entre l'animal et les expérimentateurs.

- Remplacement : Le rat est un des modèles les plus pertinent et très utilisé pour étudier les processus neurobiologiques de la mémoire. Il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle in silico d'étude de ces processus complexes qui sous-tendent la mémoire en général, de travail en particulier.

D'un point de vue fondamental, il s'agit de comprendre le rôle des noyaux reuniens et rhomboïdes de la ligne médiane du Thalamus dans les processus qui sous-tendent la mémoire de travail. D'un point de vue médical, ces recherches permettront de mieux comprendre, pour pouvoir les traiter, les déficits de mémoire de travail qui s'expriment par exemple après un accident vasculaire cérébral au niveau du thalamus, ou même au cours du vieillissement cérébral.

**9279** Nous souhaitons récolter la semence de 10 chats d'une chatterie par la méthode d'électro-éjaculation afin de caractériser la qualité de la semence, évaluer la répétabilité de la méthode et déterminer ses conséquences sur la muqueuse rectale.

La méthode utilisée est l'électroéjaculation sous anesthésie. Cette méthode est réalisée chez l'homme paraplégique (procréation assistée) et chez bon nombre d'animaux sauvages de manière courante, en particulier chez les félinés sauvages. Le chat est donc le modèle expérimental de choix pour l'évaluation de la technique.

L'évaluation des effets locaux sera réalisée sur biopsie de la muqueuse rectale sous endoscopie. Cette procédure est réalisée de manière courante en médecine vétérinaire comme chez l'Homme.

Cette méthode consiste à insérer une sonde par voie rectale et stimuler (stimulation équivalente à l'intensité fournie par une pile ; voltage maximal : 3V) de manière répétée afin d'induire une érection et une éjaculation. Le niveau d'inconfort ressenti par l'animal est a priori nul, étant anesthésié au moment du prélèvement ; aucune gêne n'est observée au moment du réveil.

Les problématiques soulevées sont les suivantes :

Cette méthode est-elle répétable ?

Est-ce que cette méthode induit des lésions de la muqueuse rectale?

Pour répondre à la question, une endoscopie rectale avant prélèvement et après prélèvement sont prévues (pour observer en visuel la muqueuse), suivi de 6 biopsies d'une zone où la sonde d'électroéjaculation n'a pas été en contact avec la muqueuse colique (côlon ascendant), puis la réalisation de 6 biopsies sur le site de réalisation.

Le but est d'observer en visuel et au microscope (histologie des biopsies) la présence ou l'absence de lésions associées à cette méthode de prélèvement.

L'essai sur animal, en l'occurrence le chat, ne peut être évité ; il n'existe pas de méthodes alternatives in vitro.

Le nombre de chats à utiliser dans l'essai se limite au nombre de 10 afin d'atteindre une robustesse statistique.

**9280** Le corps humain est capable de synthétiser des cannabinoïdes de façon endogène, nommé endocannabinoïdes (eCA). Ils sont impliqués dans des processus physiologiques fondamentaux dont la régulation de la fonction reproductive. Les eCA majeurs agissent via les récepteurs sur lesquels agissent également les ligands des composants principaux du cannabis. Une étude menée aux Etats-Unis a permis de mettre en exergue que l'utilisation chronique ou fréquente de cannabis, était associée au développement de cancer du testicule. En effet, les hommes consommant du cannabis de façon hebdomadaire ont un risque 2,5 fois plus élevé de développer un cancer du testicule, la probabilité de développement de cette pathologie augmentant significativement avec la durée de consommation. La consommation de cannabis étant liée au développement du cancer du testicule, dont l'origine est une dérégulation de la maturation des cellules germinales, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle de la voie de signalisation des eCA dans ce processus physiologique.

L'Objectif de ce projet sera de vérifier l'effet d'antagonistes spécifiques des récepteurs aux eCA in vivo sur la maturation des cellules germinales afin de comprendre quels sont les mécanismes pouvant participer au développement de cancer du testicule suite à la consommation de cannabis. Pour répondre à cet objectif, nous utiliserons des outils pharmacologiques déjà utilisés dans la littérature, l'AM630 et le Rimonabant hydrochloride, inhibiteurs des récepteurs aux eCA. Notre première approche consistera à traiter des fragments de testicules provenant de souris mâles Swiss âgées de 5 jours avec l'un et/ou l'autre des inhibiteurs précédemment cités. En fonction des résultats obtenus nous traiterons des souris gestantes Swiss non-consanguines par voie orale avec l'AM630 et/ou le Rimonabant hydrochloride à la dose de 10 mg/kg/jour. Nous évaluerons ici l'effet de l'inhibition des voies de signalisation via les récepteurs eux eCA, cet effet pouvant être médiée soit par des effets direct sur la gonade (études ex et in vivo), soit par un effet indirect via la voie centrale (étude in vivo). Le projet nécessite l'utilisation de 474 souris et tient compte de la règle des 3R. Afin d'appliquer des mesures de remplacement, nous aurons recours à une étude ex vivo qui devrait nous permettre de mieux cerner les conditions expérimentales à tester in vivo. Les cultures de testicules nécessitent également l'utilisation d'animaux mais de manière beaucoup plus restreinte car seul un âge est considéré dans ce cas et chaque testicule peut constituer en lui-même un réplica expérimental. Nous travaillerons avec le nombre minimum d'animaux permettant d'avoir des données statistiquement utilisables permettant ainsi d'appliquer les mesures de réduction. Enfin, dans le but de prendre en compte les mesures de raffinement les drogues utilisées seront administrées dans des bonbons appétant auxquels les souris seront habituées au préalable ce qui permettra d'éviter toute contention et donc stress de l'animal.

**9281** La coelioscopie est une technique chirurgicale de plus en plus utilisée en pratique courante chez le cheval pour la réalisation de diverses interventions dans la cavité abdominale. L'avantage majeur par rapport à la chirurgie conventionnelle réside dans le fait qu'elle ne nécessite pas d'anesthésier et de coucher le cheval, pratique à risque élevé dans cette espèce. La coelioscopie fait appel à du matériel et à des manipulations chirurgicales très spécifiques qui nécessitent un apprentissage avant leur mise en œuvre sur des cas cliniques.

Ce projet a pour objectif de proposer une formation à la coelioscopie sur cheval debout à destination des vétérinaires praticiens. La formation commence par une présentation théorique des indications de la coelioscopie, du matériel utilisé, de la préparation du patient et des techniques de mise en

œuvre. Elle est suivie de démonstrations vidéo puis d'ateliers de manipulation des instruments dans des boîtes d'entraînement (mimant l'environnement clos de la cavité abdominale). La dernière partie consiste en une démonstration de procédures courantes en coelioscopie par deux chirurgiens expérimentés, chez deux chevaux, puis en la réalisation des interventions, sur trois chevaux supplémentaires, des procédures par les apprenants, sous supervision étroite (un superviseur par cheval minimum).

Les chevaux seront mis à jeun selon un protocole progressif sur 3 jours (protocole de routine en pratique) et opérés via un abord coelioscopique dans le flanc.

Deux chevaux seront utilisés tous les ans dans le cadre de démonstrations par les instructeurs (chevaux acquis dans ce but ou chevaux de propriétaires nécessitant une intervention, après signature du consentement adéquat). Trois autres chevaux seront utilisés dans le cadre de l'apprentissage de la technique par les apprenants. Le nombre total d'animaux utilisés sur les 5 années couvertes par le présent projet est de 25.

Les chevaux seront suivis en post-opératoire durant 3 à 7 jours selon la durée de l'hospitalisation et les éventuelles complications attendues suite aux interventions. Ils seront hospitalisés en boxes et sortis à minima bi-quotidiennement en main. En l'absence de complications, les chevaux opérés par les apprenants pourront être utilisés comme chevaux d'enseignement ou placés.

Cette formation implique une pratique sur le cheval, espèce cible des interventions, avec une conformation de l'abdomen et une anatomie des organes caractéristiques (des formations existaient antérieurement sur le cochon anesthésié mais ne permettent pas l'apprentissage adapté des procédures chez le cheval). Les participants auront au préalable un apprentissage sur vidéo et matériel inerte, renforcé par des démonstrations commentées effectuées par des experts. Le nombre de chevaux utilisés est adapté au nombre minimal nécessaire pour que la formation soit suffisante pour les apprenants afin qu'ils soient capables d'utiliser cette technique sans danger pour leurs patients. Le nombre de sujets est adapté au nombre de participants et à la nécessité de suivre les procédures chez le mâle et la femelle.

**9282** La consommation de viandes et charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Des études expérimentales à l'aide de modèles animaux ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme héminique est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur, et cela serait expliqué par sa capacité à induire une forte lipoperoxydation fécale. Par ailleurs, il a récemment été montré qu'un régime riche en fer héminique augmentait la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale ainsi que l'inflammation et la génotoxicité de la muqueuse colique. En parallèle, il a été établi que des altérations de la fonction de barrière de l'intestin surviennent lors d'épisodes stressants, chez l'homme et l'animal.

Dans ce projet, nous souhaitons comparer l'effet de la consommation de fer héminique chez des souris ayant une barrière intestinale intacte et chez des souris ayant une barrière intestinale perturbée. Nous utiliserons pour cela un modèle de stress psychologique appelé stress de séparation maternelle. 20 souris gestantes seront nécessaires pour obtenir au minimum 40 souriceaux mâles et 40 souriceaux femelles. Au total, 100 souris seront donc incluses dans cette étude. Il est nécessaire de séparer les mâles des femelles car les effets du stress de séparation maternelle varient en fonction du sexe. Des souris C57Bl6 seront utilisées car des effets du stress de séparation maternelle et de la consommation du fer héminique ont déjà été montrés chez cette espèce. Nous étudierons sur ces animaux la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, la réponse inflammatoire et la génotoxicité au niveau de la muqueuse colique, ainsi que des marqueurs de peroxydation lipidique dans les fèces. Cette étude sera conduite dans le respect du principe des 3R, le nombre des animaux est réduit au maximum (10 souris par groupe) pour maintenir une puissance statistique suffisante. Les souris seront hébergées dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Des points limites en terme de bien-être animal ont été déterminés et les manipulations ainsi que l'isolement des souris seront réduits au minimum. L'utilisation de modèle animal est indispensable pour intégrer l'ensemble des interactions de l'écosystème colique.

**9283** La croissance progressive des tumeurs malignes nécessite un débit sanguin adapté, fourni par des vaisseaux néoformés, permettant l'apport d'éléments nutritifs et d'oxygène nécessaires à cette croissance pathologique. Parmi les différents facteurs potentiellement impliqués, l'Adrénomédulline a retenu notre attention. Il s'agit d'un peptide vasoactif impliqué dans la régulation du débit sanguin tissulaire via son action vasodilatatrice. Mais le rôle de ce peptide ne se limite pas à réguler le tonus vasculaire et la pression artérielle. Il peut également agir sur l'endothélium vasculaire lui-même. De nombreux travaux ont ainsi montré le rôle important joué par le système de l'Adrénomédulline (ligand et récepteurs) dans la mise en place d'une angiogenèse stable et fonctionnelle nécessaire à cette croissance tumorale.

Dans le cadre d'un projet de coopération européenne, cette étude a pour but de tester l'efficacité d'anticorps monoclonaux ciblant l'AM sur la croissance tumorale de plusieurs modèles tumoraux puisque (tumeur cérébrale, colon et poumon). Le processus de développement d'une substance originale comme médicament exige, après l'étude in vitro sur des cellules en culture, de valider son utilisation in vivo c'est à dire sur animal de laboratoire vivant afin de prendre en compte le microenvironnement tumoral. Un minimum d'animaux par groupe expérimental nécessaire aux conclusions statistiques sera utilisé soit 10 souris par expérimentation. Toutes les expérimentations seront réalisées en duplicate pour valider les résultats obtenus. Nous mettrons également en place un système d'analyse conduisant à l'arrêt ou à la poursuite des travaux après chaque phase d'expérimentation selon la significativité des résultats obtenus. La prise en compte de ces différents groupes expérimentaux pour les différentes pathologies cancéreuses testées nécessitera donc un nombre total maximum de souris sur 2 ans de 400. Afin de mener à bien ces expériences, nous réaliserons une analgésie au buprénorphine en pré- et post-opératoire afin d'éviter la douleur. Nous nous assurerons de détecter toute souffrance de l'animal corrélée avec la taille de la tumeur. Le suivi sera réalisé quotidiennement par une personne expérimentée. Ces souris seront hébergées dans des cages avec un nombre adéquat de souris par cage et dans un environnement optimum avec la présence d'un enrichissement du milieu. La mise en évidence de l'efficacité d'un tel anticorps AM constitue un atout pour le développement d'une nouvelle thérapeutique.

**9284** Les opioïdes endogènes comme les enképhalines ont un effet antalgique limité du fait de leur dégradation rapide par les enzymes (enkephalinases) alors que la morphine (exogène) présente un effet analgésique puissant mais pourvu de nombreux effets secondaires (accoutumance voire dépendance, constipation nausées et surtout dépression respiratoire) qui limite son usage. Ainsi, les inhibiteurs d'enkephalinases (IEnk) peuvent constituer un moyen efficace et à moindre risque pour traiter la douleur car dépourvus d'effets secondaires. Leur activité antalgique a été montrée dans divers modèles de douleur aiguë, inflammatoire, neuropathique chez le rongeur sans révéler d'effets secondaires. La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements proposés ont une efficacité limitée, surtout au stade chronique de la maladie. Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Dans ce cadre, nous souhaitons dans ce projet répondre à deux problématiques :

- étudier le site d'action, périphérique et/ou central, d'un 1er IEnk (IEnk1) dont l'action antimigraineuse a été montré dans une étude antérieure (modèle de migraine par injection répétées (5) d'un donneur de monoxyde d'azote (NO) chez le rat).

- évaluer les effets antalgiques d'un 2eme IEnk (IEnk2) dans le modèle.

Chez le rat male adulte (200-250g), nous testerons l'hypersensibilité cutanée faciale développée à la suite d'injections intrapéritonéales (i.p) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg), connu comme un donneur de NO vasodilatateur et qui déclenche chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales de la migraine est l'hypersensibilité à la douleur mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets des deux IEnk sur la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique légère (retrait de la face) de rats soumis à 1 seule ou 5 injections (stade persistant chronique) d'ISDN.

Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse



de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 15 à 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN.

Dans le cadre de la 1<sup>ère</sup> problématique (identification du site d'action antalgique de l'Enk1), 2 groupes de 10 rats seront utilisés, tous deux recevant 20 mg/kg d'Enk1 par voie intraveineuse avec dans un cas un groupe qui recevra préalablement un bloqueur périphérique des enképhalines (5mg/kg sc) et dans l'autre un groupe qui recevra une injection préalable de sérum physiologique (témoin). Les deux groupes seront soumis à 5 injections répétées d'ISDN et les effets sur la sensibilité mécanique seront mesurés ensuite toutes les 1/2 heures sur une période 4h post ISDN.

Les effets du Enk2 seront testés sur 2 groupes de rats (n=10/groupe), avec dans un groupe les rats qui auront reçu par voie orale l'Enk2 (100mg/kg) et un groupe témoin constitué de rats soumis à l'administration orale de sérum physiologique.

Au total 40 animaux seront utilisés dans ce projet. Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Le nombre d'animaux par groupes et du nombre de groupes est réduit au maximum tout en permettant une discrimination des effets antalgiques potentiels.

Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie. mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une euthanasie par injection létale d'anesthésique. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique.

**9285** La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative entraînant notamment d'importants troubles moteurs, et qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Aujourd'hui 1 Français sur 5, de 60 ans ou plus, est atteint par cette maladie chronique, qui affecte le système dopaminergique. En 2050 ce sera 1 Français sur 3. Les traitements pharmacologiques actuels permettent d'atténuer les symptômes, mais n'ont aucun effet curatif, ne permettent pas de ralentir le développement de la pathologie, entraînent des effets secondaires très gênants et leurs effets s'amenuisent au cours de l'évolution de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, intervenant essentiellement à un stade avancé de la maladie de Parkinson, a également une action uniquement symptomatique. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'enrayer ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

De récentes études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique). Notamment, les résultats démontrent que l'illumination NIR atténue les symptômes en améliorant les performances motrices, mais aussi préserve les neurones dopaminergiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer à long terme, la durabilité et la fonctionnalité d'un nouvel implant permettant l'illumination NIR, afin de soutenir une application clinique imminente. Un modèle alternatif ex vivo, n'existant pas, le projet prévoit le recours à un maximum nécessaire de 5 primates, provenant d'élevages reconnus, afin d'assurer la validité des résultats. Le modèle primate sera utilisé en raison de ses similitudes anatomiques fortes avec l'Homme, permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation de l'implant en pratique clinique. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par le vétérinaire de l'installation et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance ou douleur lors des interventions sur les animaux. L'application de critère d'arrêts et le suivi quotidien des animaux assurent leur bien-être. Les études menées précédemment au

laboratoire, nous laissent penser que le comportement et le bien-être des primates ne seront pas affectés par la mise en place de l'implant NIR. Cependant, en cas d'effets inattendus, telle que la perte de poids importante ou le rejet de l'implant, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie anticipée.

**9286** En France, la Haute Autorité de Santé estime l'incidence des lésions médullaires traumatiques à environ 1200 nouveaux cas par an. Plus de la moitié de ces patients sont des hommes de moins de 35 ans. Parmi les complications fréquentes associées à la lésion du système nerveux central on compte le développement pathologique de tissu osseux dans les régions péri-articulaires encore appelé « ossification hétérotopique neurogène » (NHO). Le développement de NHO constitue un facteur de morbidité majeur pour ces patients. Du fait de la méconnaissance des processus physiopathologiques en cause, il n'existe à l'heure actuelle aucune thérapeutique préventive efficace sur ces ossifications et le traitement consiste en une exérèse chirurgicale invasive et délabrante. Dans des travaux antérieurs nous avons pu développer un modèle animal de NHO chez des souris C57Bl6J en associant une section de la moelle épinière thoracique à une injection intra musculaire de cardiotoxine. Cependant ce modèle murin comporte plusieurs limites en termes de transposition à l'homme : le stimulus local est une lésion musculaire chimique n'ayant pas lieu chez les patients, la nature endochondrale du processus d'ossification ectopique observé chez la souris n'a pas pu être démontrée et la localisation des ossifications est intramusculaire et non péri articulaire. L'objectif du projet actuel est de développer un modèle animal de NHO qui soit plus proche de la pathologie humaine et utilisable à des fins précliniques. Pour cela, nous appliquerons la procédure expérimentale décrite chez la souris au rat. Le recours à cette nouvelle espèce nous permettra de respecter les principes de réduction et de raffinement. En effet le rat étant plus gros que la souris, nous pourrions remplacer le stimulus intramusculaire par un stimulus articulaire. Ce stimulus articulaire consistera en une injection pro-inflammatoire dans le genou selon un modèle largement décrit dans la littérature scientifique. Nous espérons ainsi obtenir une ossification endochondrale péri-articulaire similaire à celle du patient paraplégique. Nous veillerons à héberger les animaux dans un environnement enrichi, à utiliser des protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales programmées, à suivre assidûment les animaux en cours d'expérimentation, et à appliquer des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées. La mise en place de ce nouveau modèle nous permettrait dans un second temps d'appliquer des procédures d'exploitation in vivo, comme l'analyse des ossifications par imagerie non invasive (échographie) et l'analyse cinétique de marqueurs sériques par prélèvements sanguins itératifs. Ces procédures assureraient une réduction importante du nombre d'animaux utilisés dans le cadre de l'exploitation de ce modèle de NHO. Un nombre total de 32 animaux est prévu sur 1an

**9287** La cirrhose hépatique d'origine alcoolique ou virale est une cause majeure de morbidité et mortalité. Cette pathologie est associée à des infections bactériennes (sepsis, péritonite) en raison de défaillances des systèmes immunitaires notamment des neutrophiles qui représentent la première ligne de défense cellulaire innée (55-65% des leucocytes sanguins). Notre avons récemment montré que les neutrophiles des patients ayant une cirrhose alcoolique avancée sont sévèrement défaillants pour diverses activités anti-infectieuses telles que la production massive de formes réactives de l'oxygène (FRO) via la NADPH oxydase 2 (NOX2) (explosion oxydative), le relargage de la myéloperoxydase (dégranulation) et l'activité bactéricide. Ces défaillances fonctionnelles sont également associées à des déficits de signalisation intracellulaire et d'expression de la NOX2. Nous avons pu corriger toutes ces défaillances à l'aide d'agonistes des récepteurs Toll 7/8 (TLR7/8) tels que le CL097 ou le Résiquimod (R848) in vitro mais aussi ex-vivo dans le sang des patients. Ces agonistes pénètrent dans les cellules et stimulent des récepteurs TLR7/8 intracellulaires exprimés dans les endosomes, et favorisent ainsi des voies de signalisation majeure et les activités bactéricides associées, ainsi que la synthèse de NOX2. Ces agonistes font l'objet d'une demande de brevet en cours en vue de traiter les infections bactériennes chez les patients cirrhotiques.

Notre projet vise à établir la preuve du concept en évaluant les propriétés anti-infectieuses du Résiquimod dans un modèle de rats immunodéprimés et infectés, dans le contexte de la cirrhose hépatique. Les effets du Résiquimod seront étudiés principalement sur le taux de mortalité des animaux qui développent une péritonite et des activités anti-infectieuses des phagocytes sanguins (production de FRO), le taux de bactérie dans le sang et liquide péritonéal ainsi que les marqueurs d'atteintes hépatiques. La faisabilité du projet est renforcée par des travaux d'autres équipes montrant que le Résiquimod améliore la survie des souris nouveau-nées (non cirrhotiques) qui développent une péritonite. De plus, le Résiquimod fait l'objet d'une vingtaine d'essais cliniques pour ses nombreux effets bénéfiques, comme adjuvant de vaccination, antiviraux et traitement des verrues. Enfin, le Résiquimod supprime également la fibrose hépatique induite par ligature du canal biliaire et le tétrachlorure de carbone (CCL4) chez des souris.

Ce projet se déroulera sur une période de 15 mois, en collaboration étroite avec des hépatologues et un chercheur qui maîtrise les procédures d'induction de la cirrhose biliaire et péritonite chez les rongeurs. Deux modèles de cirrhose déjà validés par des équipes de notre Centre de Recherche, seront utilisés. Le premier est induit par ligature du canal biliaire (« Bile duct ligation, BDL») après ouverture de la cavité abdominale et l'autre par administration orale de tétrachlorure de carbone (CCL4) qui a l'avantage d'éviter l'opération chirurgicale. Cependant, ces deux modèles induisent un faible taux de mortalité des animaux (environ 10%) qui ne permet pas judicieusement d'étudier l'efficacité du Résiquimod. Nous proposons ainsi de ré-utiliser ces animaux cirrhotiques pour induire une péritonite aiguë par ligature et perforation du cæcum. Les études antérieures ont montré que cette procédure sévère provoque une plus grande mortalité des animaux (40-60%) en 4-5 jours. Afin de comprendre le mode d'action du Résiquimod, des prélèvements sanguins seront effectués à des temps stratégiques en vue d'étudier les modifications du taux de leucocytes sanguins circulants, la production de FRO par les phagocytes, le taux de bactéries dans le sang et le liquide péritonéal ainsi que divers paramètres biochimiques permettant de quantifier notamment les atteintes hépatiques.

Au regard de la règle des 3R, le projet utilisera un nombre réduit d'animaux (200 rats) en raison du degré de gravité (sévère) des 3 modèles de péritonite mis en place pour favoriser la mortalité des animaux (Péritonite associée au modèle de cirrhose BDL et CCL4, et péritonite seule), et pour des besoins statistiques. Concernant le raffinement, les animaux feront l'objet d'une surveillance attentive des signes extérieurs de souffrance. Dans cette étude, une grille de suivi des animaux nous permettra de mettre fin à leur souffrance par euthanasie lorsque les points limites (rats prostrés ou au contraire très agité, fuyant, poils hérissés, hypothermie et perte de poids importante) seront atteints. Enfin, ces modèles de péritonite mis en place dans le contexte de la cirrhose hépatique constituent un objectif majeur du projet et ne peuvent être remplacés d'autant que des propriétés anti-bactériennes du Résiquimod ont déjà été démontrées et publiées par l'équipe dans des modèles in vitro et ex vivo dans du sang total de patients cirrhotiques.

Ce projet original devrait apporter les premières indications montrant des effets anti-infectieux du Résiquimod in vivo dans le contexte de la cirrhose hépatique. Il constituera ainsi un tremplin en vue des essais cliniques avec des patients ayant une cirrhose alcoolique avancée, dont la finalité vise à améliorer leur état de santé et survie notamment pour ceux qui sont en attente de greffe.

## **9288** CONTEXTE

Les épidémies de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge.

La flambée d'Ebola de 2014 a nécessité la déclaration de l'état d'urgence internationale par l'OMS et a été responsable de plus de 28000 cas dont 11000 décès. Cette épidémie sans précédent a montré comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria, le Nigéria et le Sénégal. Aujourd'hui, la République Démocratique du Congo est touchée.

### **OBJECTIF**

Il n'existe pas de vaccin ou prophylaxie homologuée à ce jour. Il est donc urgent de développer des vaccins pré/post-exposition efficaces.

Nous proposons à travers ce projet une approche thérapeutique utilisant un sérum hyper immun provenant de primates non humains (PNH) vaccinés. La survie sera étudiée ainsi que la propagation du virus dans le sang et dans les organes, les paramètres biochimiques et hématologiques des animaux.

Il sera effectué dans notre établissement la partie traitement par le sérum hyper immun, le challenge viral et le suivi.

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

Ce projet de recherche d'une durée de 2 ans appliquée pour le traitement de maladie, composé d'une procédure jugée sévère, nécessite l'utilisation de 12 macaques cynomolgus. Des groupes de 4 animaux sont mis en place traités soit par le sérum hyper immun soit par un sérum classique (une injection intra veineuse quotidienne de 6 minutes sur 5 jours consécutifs ou 5 jours consécutifs puis 3 jours décalés. Ils subiront une injection intramusculaire de virus après une période de 10 jours d'acclimatation. Ensuite, pendant 21 jours les animaux seront suivis, du sang sera prélevé (veine fémorale) 2 à 3 fois par semaine (volume par semaine inférieur à 7.7% du volume de sang total de l'animal). Les animaux atteignant le point limite et les animaux survivants 21 jours post infection seront euthanasiés puis autopsiés.

Conformité avec les 3R :

Il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire les phénomènes de l'infection par le virus Ebola ou de mimer la complexité du système immunitaire. De plus l'espèce PNH est essentielle pour modéliser la pathologie humaine et tester de nouveaux traitements potentiels.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables afin d'explorer la meilleure approche pour observer l'action protectrice des anticorps et du vaccin.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola, la souris n'y est pas sensible. L'anticorps utilisé dans ce projet vise la molécule humaine mais il trans-réagit avec la molécule chez le PNH mais pas avec la molécule de la souris.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring éprouvé qui reprend les observations du comportement, des symptômes hémorragiques. Les animaux seront suivis quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Un examen clinique sera effectué à chaque anesthésie. Le temps de travail en animalerie A4 étant règlementée, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

**9289** Bien que des avancées majeures, particulièrement dans le domaine médical, sont prédites grâce au développement des nanotechnologies, des inquiétudes sont émises quant aux effets potentiels des nanoparticules manufacturées (NPM) sur la santé humaine, particulièrement au niveau respiratoire. Des études réalisées chez la souris et s'intéressant à la toxicité respiratoire des NPM montrent qu'une exposition aux NPM peut entraîner un remodelage pulmonaire (fibrose, emphysème, ...), qui pourrait être associé à des conséquences fonctionnelles délétères si ces effets étaient observés chez l'Homme. L'induction d'un stress oxydant et d'une réponse pro-inflammatoire est proposée comme un mécanisme essentiel de ces effets. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à être complètement élucidés. L'autophagie est une voie de signalisation très conservée, véritable pilier de l'homéostasie cellulaire. Plusieurs études suggèrent un rôle clé pour l'autophagie dans la pathogenèse et/ou la progression de pathologies humaines comme la fibrose ou le cancer. L'hypothèse de ce projet est qu'une autophagie défectueuse pourrait représenter un nouveau mécanisme expliquant, au moins en partie, l'effet toxique des NPM. L'objectif principal du projet est donc de comprendre le rôle de l'autophagie dans la réponse pulmonaire à des NPM. Pour ce faire, une première partie du projet consistera à caractériser l'autophagie induite par 4 NPM choisies pour leurs nombreuses applications actuelles et connues pour entraîner un remodelage pulmonaire chez la souris. Nous travaillerons ainsi avec deux grandes classes de NPM : les nanotubes de carbone (NTC) et les nanoparticules d'oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Puisque la modulation de certaines caractéristiques physico-chimiques modifie leurs effets pulmonaires, deux types de NTC seront utilisés (courts et longs), ainsi que deux types de TiO<sub>2</sub> (recouverts ou non de nanoparticules d'or). La

réponse autophagique à ces 4 NPM sera mise en regard de leurs effets pulmonaires (remodelage, inflammation, stress oxydant, fonction respiratoire), à plus ou moins long terme (24 heures, 1 mois, 3 mois). Dans un deuxième temps, nous utiliserons des souris déficientes pour l'autophagie afin d'évaluer son rôle dans la réponse pulmonaire aux NPM. L'utilisation de souris est essentielle à la bonne réalisation du projet de façon à permettre, en plus de la caractérisation des mécanismes biologiques sous-jacents à des expositions aux NPM, l'évaluation des conséquences fonctionnelles respiratoires de telles expositions.

La toxicité potentielle des nanoparticules manufacturées représente une question essentielle en santé publique. À l'heure actuelle, aucune donnée chez l'Homme n'est disponible. Si les données obtenues grâce à l'exposition de différents types cellulaires (notamment pulmonaires) sont importantes pour la compréhension des effets toxiques des nanoparticules manufacturées, le recours aux animaux est indispensable pour progresser dans cette connaissance, notamment parce qu'ils permettent la réalisation des tests fonctionnels respiratoires, irréalisables lors d'expérimentations sur cellules in vitro.

Chaque animal est anesthésié par une administration intra-péritonéale de kétamine 10% et Xylazine 10% dilué dans du sérum physiologique. Il est ensuite administré par voie oro-pharyngée avec 10µl d'une solution de NPM à 5 mg/ml diluée dans du sérum physiologique. Il est placé sur un tapis chauffant pour un réveil optimal, qui se fait sous la surveillance de l'expérimentateur.

Ce projet utilisera un maximum de 900 souris sur 5 ans. La stratégie expérimentale prévue en deux étapes (caractérisation puis modulation de l'autophagie) permettra d'adapter les effectifs en fonction des résultats obtenus dans la première partie du projet ; utilisation de moins de NPM (si des différences entre elles ne sont pas identifiées), cinétique d'analyse moins lourde (suppression d'un temps d'euthanasie ; si les effets sont vus dès 1 mois, suppression du temps 3 mois – ou si ils ne sont vus qu'à 3 mois, suppression du temps 1 mois).

**9290** De plus en plus d'études concentrent leurs recherches sur la physiologie, le métabolisme et la santé de la vache laitière en transition. La phase de transition est définie comme la période s'étalant entre 3 semaines pre-partum jusqu'à 3 semaines post-partum. En effet, pendant cette période, la grande majorité des vaches laitières souffre d'un état inflammatoire systémique. L'apparition d'un état inflammatoire en période post-partum a été documentée dans plusieurs espèces, y compris les bovins, les souris, les porcs et les humains. Bien que les premières études aient porté sur des marqueurs inflammatoires et des affections telles que la mammite et la métrite, de nombreuses études actuelles démontrent que les marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation sont présents en concentration élevée dans les jours suivant la parturition, même en l'absence de maladie. Par ailleurs, l'alimentation des vaches laitières avec des rations à forte densité énergétique (riches en céréales) pendant toute la durée de leur lactation modifie l'environnement du microbiote dans le rumen et l'intestin, conduisant à la libération de grandes quantités de lipopolysaccharides (LPS) provenant de bactéries, induisant une réponse inflammatoire. Les potentiels troubles digestifs, tel que l'acidose ruminale subclinique, occasionnés par ce type de ration contribuent à une rupture de l'homeostasie induisant un état inflammatoire.

En conséquence, il est nécessaire d'étudier des stratégies alimentaires permettant de prévenir cet état inflammatoire chronique (i) autour du vêlage et (ii) durant la lactation où les épisodes d'acidose ruminale sont nombreux. Pour cela nous souhaitons vérifier que la levure vivante peut aider à la prévention d'un état inflammatoire systémique de l'animal autour du vêlage et d'un état inflammatoire plus ponctuel lors de l'apparition de troubles digestifs comme l'acidose ruminale subclinique.

A notre connaissance, aucune étude portant sur les effets de la levure vivante sur le statut inflammatoire de la vache laitière n'est disponible. En l'absence de modèle in vitro validé pour l'objectif de l'étude, le recours à des animaux est nécessaire. L'essai sera réalisé sur 12 vaches laitières gravides de race Prim'Holstein et porteuses d'une canule au niveau ruminal, effectif minimum nécessaire pour pouvoir exploiter les résultats à l'aide de tests statistiques non paramétriques. La moitié d'entre-elles recevront une dose quotidienne de levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) dès 3 semaines pre-partum jusqu'à 3 semaines post-partum. Les prélèvements de liquide ruminal seront réalisés uniquement via la canule, afin de mesurer les paramètres physicochimiques, microbiologiques et fermentaires du métabolisme du rumen. Des prélèvements ponctuels de sang

seront aussi effectués pour évaluer l'état immunitaire et inflammatoire de l'animal : 1 fois par semaine pendant les 3 semaines précédant le vêlage puis à T+24h, T+48h, T+4 jours puis une fois par semaine jusqu'à 3 semaines post-partum. Les animaux seront logés dans une étable munie d'une ventilation dynamique et de tapis afin de leur assurer des conditions de confort et de bien-être. Par ailleurs, une surveillance biquotidienne des animaux sera mise en place pendant toute la durée du projet. Les animaux sont gardés en vie à la fin de l'expérimentation et poursuivront leur carrière de vache laitière.

**9291** Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

Le cancer affecte des millions de personnes chaque année. Cette pathologie a donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter le cancer ont une efficacité limitée pour certaines indications comme par exemple le cancer du pancréas ou le cancer du poumon et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces ayant un effet anti-tumoral démontré. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Les retombées attendues incluent le screening in vivo de nouvelles molécules efficaces, l'étude si besoin de leur mécanisme d'action et l'évaluation des meilleurs candidats avant une éventuelle utilisation en clinique chez l'homme. Ainsi, ces études permettront de trouver potentiellement de nouveaux médicaments dont les effets seraient supérieurs aux molécules de référence déjà existantes.

Afin de pouvoir évaluer de façon rapide et pertinente l'effet de nouvelles molécules, la technique du « hollow fiber assay » est intéressante car elle permet de déterminer l'efficacité d'une molécule sur plusieurs indications thérapeutiques en même temps dans un contexte in vivo. Ce modèle permet alors en moins d'une semaine de discriminer les cellules cancéreuses sensibles à un traitement. Les composés dont l'efficacité potentielle sera testée dans ce modèle auront fait l'objet auparavant d'études in vitro afin de limiter l'expérimentation animale au maximum et de se concentrer uniquement sur les molécules avec une réelle potentialité et/ou pertinentes pour les études mécanistiques. La technique s'emploie donc après les études in vitro initiales et en amont d'un protocole de xénogreffe classique qui est plus lourd (car utilisant plus d'animaux) et moins discriminatif (une indication testée). Cette technique consiste à insérer 3 fibres creuses contenant chacune une suspension de cellules cancéreuses différentes sous la peau de la souris au niveau du cou. 3-4 jours après l'implantation, le traitement de la nouvelle molécule à tester peut commencer à raison d'une fois par jour pendant 4 jours. Au cinquième jour, les animaux sont euthanasiés et les fibres retirées pour pouvoir analyser la quantité de cellules restantes par rapport aux témoins négatif et positif. L'utilisation de la souris comme modèle d'étude permet de tester le traitement dans un contexte physiologique. Ce projet sera réalisé sur des souris immunodéficientes pour pouvoir implanter des cellules d'origine humaine sans rejet.

Il est estimé que 900 animaux seront nécessaires pour réaliser 30 études pendant une durée de 5 ans. Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 6 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an.

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

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

Pour les expérimentations, il a été prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement. Ce protocole ne sera mis en place qu'avec des lignées cancéreuses qui auront répondu au traitement lors d'études in vitro préliminaires afin de limiter l'utilisation des animaux.

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

La procédure d'implantation en sous-cutanée des fibres se fera à l'aide d'un trocart, sous anesthésie générale et une analgésie pré- et post-chirurgicale est prévue. Les souris seront suivies quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement de la souris (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps (mesuré tous les jours) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux pour pouvoir tester l'effet du traitement sur la viabilité cellulaire dans un contexte physiologique.

**9292** Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association d'extraits de 5 plantes sur le métabolisme énergétique de souris diabétiques et de souris nourries avec des régimes riches en graisse, notamment sur les profils lipidiques sériques et hépatiques, sur la glycémie, la sensibilité à l'insuline, et la composition corporelle des animaux. Une purification de cet extrait brut a été réalisée et cet extrait purifié va être tester afin d'en mesurer son efficacité sur le développement de la stéatose hépatique due à l'induction d'un régime riche en graisse. D'autres paramètres seront également évalués tel que des marqueurs de l'inflammation systémique et hépatique, ainsi que des marqueurs sériques de toxicité hépatique.

L'étude a été réalisée selon la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) :

- L'étude se compose de 7 groupes de 12 souris C57BL/6J mâles âgées de 12 semaines en début de protocole. Les souris vont être nourries avec un régime riche en graisse (HFD) supplémenté avec les extraits de plantes purifiés pendant 7 semaines. Les traitements seront incorporés dans la nourriture des animaux. Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur les modèles similaires, un minimum de 12 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

- Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, mesure de la glycémie à jeun, insulinémie, triglycérides (TG) et cholestérol total) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Les mesures de la composition corporelle et le taux de cholestérol total seront réalisées une fois en début de protocole (S0), et une fois en fin de protocole (S7). Et un suivi hebdomadaire du poids et de la glycémie, insulinémie et triglycémie à jeun sera réalisé (S0, S1,S2,S3,S4,S5,S6 et S7). Ces mesures étant espacées de plusieurs jours, ce qui diminue le stress des animaux. De plus un gavage aux glucides sera réalisé une seule fois en fin de protocole (S7) pour la sensibilité à l'insuline.

- Le modèle de souris (C57BL/6J) nourri avec un régime riche en graisse (HFD) est particulièrement bien adapté à l'étude de la dyslipdémie et au développement de la stéatose hépatique. Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme de dyslipidémie, d'obésité et de stéatose hépatique sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement in vivo.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 120 souris mâles C57BL/6J seront utilisées pour cette étude.

**9293** La présence de pesticides dans notre environnement et son éventuel impact sur la santé humaine est une source de préoccupation majeure qui ne cesse de se renforcer depuis ces dernières années. Parmi eux, le chlordécone est un pesticide qui a été employé aux Antilles de 1973 à 1993 dans les bananeraies. Ce composé étant extrêmement résistant à la dégradation dans l'environnement, son utilisation a entraîné une contamination des milieux naturels et de certaines denrées alimentaires qui persiste actuellement et pour encore plusieurs décennies. En conséquence, la population antillaise est exposée de façon continue à ce pesticide qui est considéré comme un perturbateur endocrinien par l'OMS et classé cancérigène possible pour l'Homme. Différents effets de l'exposition au

Chlordécone sur la santé humaine ont été rapportés. Une étude épidémiologique a notamment montré que l'exposition au chlordécone est associée à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate.

Le chlordécone s'accumule principalement dans le foie mais il est également retrouvé dans l'appareil reproducteur mâle. La localisation précise du chlordécone au sein de ces organes et de la prostate en particulier est cependant totalement inconnue à ce jour. Or, ce type d'information pourrait aider à mieux comprendre les propriétés de perturbateurs endocriniens du chlordécone mais également le lien éventuel entre l'exposition au chlordécone et l'augmentation du risque de développer un cancer de la prostate. De plus, certains paramètres toxicologiques doivent encore être affinés pour améliorer l'évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition au Chlordécone.

Dans le but de déterminer la distribution précise du chlordécone au sein de l'appareil reproducteur mâle et d'améliorer l'évaluation des risques sanitaires du chlordécone, une étude in vivo à l'échelle de l'organisme entier est indispensable (Remplacement). Nous proposons d'utiliser le rat comme modèle animal, en raison de la taille des organes qui permet de réaliser plusieurs expériences à partir d'un même animal (Réduction).

Un total de 75 rats adultes sera divisé en 3 lots : 1- Exposition quotidienne à 5 mg/kg/jour (durée maximale d'exposition : 10 jours) ; 2- Exposition hebdomadaire à 5 mg/kg/semaine (durée maximale d'exposition : 20 semaines) ; 3- Dose unique de 1 mg/kg ou 10 mg/kg. Les doses choisies sont inférieures à la dose présentant un risque d'apparition de troubles neurologiques. Toutefois si les animaux présentent des signes de souffrance, les points limites seront appliqués. Le chlordécone sera administré par voie orale ou par voie intraveineuse. Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et bénéficieront d'une période d'adaptation préalable de 3 à 4 semaines (Raffinement).

Les organes de l'appareil reproducteur (prostate, testicule, épидидyme et vésicule séminale) seront collectés pour étudier la distribution du chlordécone dans ces organes (imagerie). Des analyses histologiques ainsi que des dosages du chlordécone seront également réalisés. La taille des organes de rats nous permettra de réaliser les différentes expériences (imagerie, analyse histologique et dosage) sur un même animal (Réduction) et justifie le choix de ce modèle animal. Par soucis de valorisation optimale des animaux utilisés, d'autres organes (foie, cerveau, rein, graisse, muscle et peau) seront récoltés et un prélèvement sanguin sera réalisé pour chaque animal afin de pouvoir étudier dans un second temps la distribution du chlordécone dans ces échantillons.

**9294** L'endométriose est une pathologie bénigne, chronique, inflammatoire et oestrogéno-dépendante, dont la physiopathologie demeure mal élucidée, bien que l'inflammation semble jouer un rôle central. L'endométriose se définit par la présence de tissu endométrial, associant stroma et glande, en dehors de la cavité utérine.

L'hétérogénéité nosologique de cette pathologie ainsi que sa prévalence élevée en font un centre d'intérêt de nombreux spécialistes. Au regard de la littérature récente, l'endométriose toucherait 5 à 15% des femmes en âge de procréer; cette prévalence étant accrue en cas de douleurs pelviennes et/ou d'infertilité.

Le diagnostic d'endométriose est fait le plus souvent après un long délai de souffrances et de nomadisme médical.

Les manifestations cliniques principales de l'endométriose sont les douleurs d'intensité variable, parfois sévères et invalidantes ; ainsi que l'infertilité, avec un impact fréquent sur la qualité de vie des femmes touchées par cette pathologie

L'existence d'une thyroïdite auto-immune pourrait participer à la physiopathologie de l'endométriose et éventuellement aux pathologies de l'interface foeto-maternelle en cas de grossesse. Il a été démontré que les hormones thyroïdiennes influencent l'endomètre, l'ovaire et de la physiologie du placenta. Des données de la littérature supportent l'hypothèse selon laquelle les hormones thyroïdiennes jouent un rôle crucial pendant l'implantation embryonnaire et les premières étapes du développement embryonnaire.

En effet il est aujourd'hui admis que les hormones thyroïdiennes et leurs dysfonctionnements sont associées à l'infertilité, ainsi que au surrisque de complications obstétricales, y compris les fausses couches spontanées et les pathologies de la grossesse, l'accouchement, et les troubles de la vie



néonatale précoce. Par ailleurs l'existence d'une association épidémiologique entre l'endométriose, maladie due à l'implantation ectopique de tissu endométrial, et les dysthyroidies, plaide pour un rôle spécifique des hormones thyroïdiennes dans l'endométriose et l'éventuel surrisque obstétrical associé.

Au cours de cette étude nous allons évaluer l'impact de la thyroïdite sur un modèle de souris endométriosiques gestantes ou non. En effet, la grossesse est une greffe semi-allogénique du fœtus chez la mère et son bon déroulement nécessite une tolérance immunitaire materno-fœtale stricte dépendant d'une adaptation du système immunitaire maternel et fœtal.

Le modèle de thyroïdite sera réalisé dans un premier temps, soit par l'injection de thyroglobuline porcine pour le modèle de thyroïdite auto-immune soit par l'ingestion per-os de perchlorate de sodium pour le modèle de thyroïdite induite. Des prises de sang seront effectuées pour nous assurer de la maladie. Dans un second temps, nous implanterons des fragments de cornes utérines à des souris atteintes de thyroïdite, afin de mimer l'endométriose. Ces souris seront accouplées avec des mâles DBA/2 pour étudier l'influence de la thyroïdite sur l'endométriose et sur la gestation. Les résorptions fœtales et les implants endométriosiques seront étudiés. Un contrôle quotidien du bien-être et de l'état général des souris sera réalisé. De l'enrichissement sera placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement de nos souris. Au total nous utiliserons 468 animaux expérimentaux (108 femelles + 360 fœtus).

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions endométriosiques en présence d'une thyroïdite auto-immune et dans les pathologies de l'interface foeto-maternelle en cas de grossesse.

**9295** La biosynthèse du coenzyme Q emploie deux voies de biosynthèse différentes selon que la bactérie *E. coli* est en contact ou non avec le dioxygène. Comme *E. coli* est connue pour faire partie de la flore intestinale et que l'intestin est un milieu pauvre en dioxygène, il faut tester si l'une ou l'autre des voies de biosynthèse du coenzyme Q est importante pour le développement d'*E. coli* dans l'intestin de souris. La souris est l'espèce la plus susceptible de fournir des résultats satisfaisants et comparables aux études publiées. La colonisation bactérienne de l'intestin ne peut être obtenue et analysable que dans un organisme entier.

Afin de répondre à cette question des expériences de compétition seront réalisées entre une souche d'*E. coli* sauvage et des souches inactivées pour des gènes d'intérêt (nommées « mutants » ci-après). Ces compétitions seront réalisées dans l'intestin des souris et la capacité de chaque souche à coloniser l'intestin sera suivie par dénombrement des bactéries dans les fèces de souris.

Avant les expériences de compétition entre les souches sauvages et mutantes, une première expérience contrôle sera réalisée pour vérifier que les souches sauvages utilisées sont capables de coloniser l'intestin de souris CD1 de façon stable sur 30 jours, comme décrit dans la littérature. Nous dénombrerons les bactéries dans les fèces fraîchement récoltées.

Chaque souche sera testée sur un groupe d'animaux. Chaque groupe sera constitué de 5 souris, nombre minimal et suffisant afin de permettre un traitement statistique approprié des résultats. 2 souches sauvages et 10 souches mutantes *E. coli* seront testées. Au total, 60 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Il n'y a pas d'effet délétère de l'alimentation et de la boisson fournie pour l'expérimentation. Dans ces expériences, la flore intestinale anaérobie ne sera pas affectée par le traitement antibiotique. Ce traitement n'entraînera pas de souffrance des animaux, ni d'effet délétère sur leur santé. Une angoisse de niveau léger est générée par le gavage. Ce stress sera limité par la manipulation habituelle et répétée des animaux.

**9296** Dans le cerveau, le système endocannabinoïde (le système par lequel agit le cannabis) a un rôle majeur dans la modulation de l'apprentissage et de la mémoire. Nous avons récemment montré que ce système affecte aussi la production d'énergie dans la cellule et que ce processus est essentiel pour la mémoire. Maintenant, nous voulons confirmer ces résultats dans un modèle génétique qui est

essentiel pour approfondir ces études. Le projet a pour finalité une meilleure compréhension du système endocannabinoïde qui pourrait permettre la mise en place de nouvelles et de meilleures cibles thérapeutiques. La durée de ce projet sera de 5 ans.

Il est essentiel d'utiliser des souris car nous voulons étudier des mécanismes et circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié. Pour caractériser ce nouveau modèle génétique nous allons utiliser 1290 souris avec différentes méthodologies comme des tests comportementaux de mémoire, l'analyse d'expression de protéines ou l'électrophysiologie in vivo.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

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

Réduction : Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 10 animaux c'est à dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. Les nombres avancés permettent de garantir une bonne interprétation des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être réduits, ces nombres seront réduits en conséquence.

Raffinement : Le milieu d'élevage des souris est enrichi (matériel de nidation). Les souris sont observées quotidiennement par un personnel qualifié afin que des mesures soient prises rapidement si des signes délétères apparaissent. De même, les animaux seront anesthésiés avec un cocktail kétamine/xylazine (10ml/kg) lorsque l'expérience le permet, afin d'éviter la souffrance des animaux

**9297** La myasthénie est une pathologie neuromusculaire chronique d'origine génétique (ie. Syndrome Myasthénique Congénital, SMC) ou immunologique (ie. Myasthénie Grave, MG) liée à un défaut de transmission entre le nerf et le muscle. Les caractéristiques principales sont une faiblesse et une fatigabilité des muscles dont la commande est volontaire tels que les muscles oculaires, faciaux, oropharyngés et ceux impliqués dans la locomotion. La MG est la forme de myasthénie la plus fréquente. Elle se caractérise par la présence d'anticorps circulants dirigés contre des protéines clés de la jonction neuromusculaire incluant principalement les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (MG-RACH) et le récepteur tyrosine kinase MuSK (MG-MuSK). Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques et non curatif.

Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'effet bénéfique d'un nouvel agent pharmacologique, le Tideglusib, un inhibiteur spécifique de nouvelle génération de l'enzyme GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3), dans deux modèles murins de MG induite chez la souris et représentatifs de la pathologie (MG-RACH et MG-MuSK). Cette analyse préclinique in vivo ne peut être remplacée par des études conduites in vitro du fait de l'absence de modèle cellulaire in vitro reproduisant la jonction nerf/muscle. Elle représente donc une étape importante avant la mise en place d'essais cliniques sur l'homme.

Les expériences comprendront différents lots de souris induites pour l'une ou l'autre des deux myasthénies et traitées ou non avec le Tideglusib. Le protocole porte sur un total de 240 animaux puisque 4 lots de 30 souris par modèle sont utilisés pour valider le modèle et tester l'effet de l'agent pharmacologique. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et obtenir des résultats statistiquement fiables. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, suite aux tests comportementaux, les animaux sont euthanasiés et les muscles sont utilisés pour réaliser les études phénotypiques. La pathologie affectant majoritairement les femmes, seules les souris femelles seront utilisées pour cette étude. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Les symptômes de la myasthénie auto-immune se traduisent par des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Les souris seront pesées et observées attentivement tous les deux jours. Le score clinique complet est évalué toutes les semaines. Nous considérons qu'une perte de poids de 20% au cours de la semaine, une grande difficulté à se déplacer ou un score clinique élevé (score calculé en tenant compte du poids, de la force au grip test et de la grille retournée) sont des points limites. Dans ces cas la souris est euthanasiée.

**9298** Les troubles du sommeil sont fréquents chez les personnes âgées. Ces dernières années, des études à la fois chez l'homme et chez les rongeurs ont mis en évidence une association entre sommeil perturbé et la maladie d'Alzheimer mais les mécanismes sous-jacents restent encore en grande partie inconnus. Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est l'une des causes des troubles du sommeil et il est caractérisé par une obstruction répétée des voies aériennes supérieures, entraînant une fluctuation du taux d'oxygène sanguin (hypoxémie intermittente), un sommeil fragmenté et des signes diurnes tels que la somnolence et des troubles de la concentration/attention/mémoire. Le SAS doublerait le risque de démence chez l'homme, et serait associé au dépôt cérébral des protéines amyloïdes  $\beta$  (A $\beta$ ) retrouvées dans la maladie d'Alzheimer. Dans les modèles animaux, l'hypoxie intermittente (IH) entraîne une anomalie électrophysiologique (plasticité synaptique) au niveau de l'hippocampe du cerveau, une perte neuronale et une production d'A $\beta$ . Les troubles cognitifs présentés par les patients souffrants de SAS sont d'ordre mnésique (hippocampe) et dysexécutif (cortex préfrontal). Or, la maladie d'Alzheimer est caractérisée au niveau physiopathologique par une altération des connexions entre les différentes régions cérébrales, notamment entre l'hippocampe et le cortex préfrontal.

En utilisant l'électrophysiologie, notre objectif est d'analyser l'effet de l'hypoxie intermittente chronique sur cette dynamique neuronale hippocampo-préfrontale, et de comparer le profil de cette dynamique neuronale entre le modèle SAS (hypoxie intermittente) et le modèle transgénique Alzheimer.

Par ailleurs les lésions cérébrales (inflammation, apoptose, sénescence cellulaire, structure des épines dendritiques, atteinte de la barrière hématoencéphalique) potentiellement induites par l'hypoxie intermittente seront corrélées avec ces anomalies électrophysiologiques au niveau de ces régions cérébrales d'intérêt.

Ces études seront réalisées chez 2 modèles expérimentaux :

- Un modèle transgénique : des souris génétiquement modifiées surexprimant une mutation humaine de la préséniline 1 (PS1 KI/KI) à l'origine de formes familiales rares et précoces de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme

- Un modèle expérimental d'hypoxie intermittente chronique : souris sauvages ou transgéniques Alzheimer exposées à l'hypoxie intermittente.

Nous procéderons à l'analyse spectrale des potentiels de champs locaux (LFP local field potential) du cortex préfrontal et du cortex hippocampique (Transformée de Fourier : FFT), à l'évaluation statistique du degré de linéarité de leurs relations chronologiques (Fonction de cohérence) et du lien temporel avec les champs de potentiels électriques locaux dans certains tests comportementaux tel que le labyrinthe en T. Ces données électrophysiologiques seront corrélées avec les lésions cérébrales induites par l'hypoxie intermittente.

L'étude électrophysiologique in vivo couplé à un test comportemental ne peut être réalisée que sur un animal, non anesthésié, dans un état de vigilance et comportemental précis. Par ailleurs, les études des lésions cérébrales (inflammation apoptose, sénescence cellulaire, perméabilité de la barrière hématoencéphalique, neurogenèse etc.) ne peuvent être réalisées que sur un animal également. Un modèle expérimental de remplacement n'est pas envisageable. Le développement de méthodes de traitement des signaux très sophistiquées ainsi que l'analyse statistique multi-variables des résultats ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ces études. L'anesthésie générale lors de la mise en place des électrodes, la procédure d'euthanasie dans une pièce dédiée à cet objectif, ainsi qu'une procédure quotidienne d'observation et d'examen, sont les pratiques expérimentales destinées à réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés dans ce projet. Au total 512 souris seront utilisées pour ce projet.

**9299** En milieu aquatique, la notion de continuité écologique correspond à la libre circulation des poissons migrateurs et au transport suffisant des sédiments dans les cours d'eau. Elle a été introduite par la Directive Cadre sur l'Eau (2000), comme un élément de qualité pour la classification de l'état écologique. La Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (2006) a imposé par la suite (Art. L.214-17 du Code de l'Environnement) le classement de certains cours d'eau, pour lesquels il est nécessaire de préserver et/ou rétablir la continuité écologique.

L'Etat français s'est engagé, via de nombreuses conventions, dans la protection et la gestion des espèces amphihalines à l'échelle internationale. Depuis plusieurs dizaines d'années, des

programmes de restauration et de protection des poissons migrateurs (anguille, saumon) existent en France. Assez récemment, l'attention s'est portée sur la problématique de la dévalaison (migration vers la mer) au niveau des aménagements hydroélectriques, l'entraînement des poissons dans les prises d'eau puis les turbines étant source de mortalités. L'anguille, espèce en danger critique, et le saumon, espèce vulnérable selon la classification UICN, sont particulièrement concernés.

Une des solutions préconisées en France pour éviter, du moins limiter, l'entraînement des poissons dans les prises d'eau, consiste à mettre en place des grilles à faible espacement entre barreaux, associés à des exutoires de dévalaison. Alors que les études hydrauliques ont montré la compatibilité de ces dispositifs avec la production d'énergie, leur efficacité biologique in situ reste à valider. Il est aujourd'hui nécessaire d'acquérir un retour d'expérience sur l'efficacité de ces dispositifs pour valider les critères de conception.

L'efficacité de telles prises d'eau, dénommées « ichtyocompatibles », est calculée comme la proportion des poissons parmi ceux qui se présentent devant le dispositif, qui sera arrêtée par la grille et rapidement guidée vers les exutoires. Afin d'obtenir un résultat fiable pour différentes configurations d'ouvrages, plusieurs sites doivent être testés. Compte tenu de ces objectifs, de la taille des sites à étudier et du comportement migratoire des espèces cibles : anguille et saumon, nous devons recourir à l'usage de la radio-téléométrie. Cette technique permet de suivre à distance les déplacements des poissons durant quelques mois. Les poissons seront marqués, sous anesthésie, avec des marques radio, par insertion chirurgicale dans la cavité abdominale pour l'anguille et par insertion de la marque dans l'estomac pour le saumon, puis relâchés dans le cours d'eau. Idéalement un suivi d'une centaine d'individus de chaque espèce au niveau de chaque dispositif de dévalaison est souhaitable pour pouvoir évaluer son efficacité. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, il a été décidé de conduire notre étude sur un tronçon de cours d'eau comprenant quatre sites en série. Ainsi les poissons déversés en amont sont susceptibles de passer par plusieurs ou tous les ouvrages étudiés et pourront potentiellement servir à l'évaluation de plusieurs sites. Compte tenu des arrêts de migration possibles et de la durée de vie limitée des marques, il a été décidé de relâcher au total 200 individus de chaque espèce pour obtenir des données suffisantes permettant l'évaluation statistique des dispositifs.

**9300** Contrairement à ce qui a été longtemps admis, le cerveau adulte continue à produire des nouveaux neurones, un phénomène conservé chez l'homme. Dans un souci thérapeutique, il est essentiel de comprendre les mécanismes permettant la migration de jeunes neurones dans un cerveau adulte. Chez la souris, la zone sous-ventriculaire produit de manière massive de nouveaux neurones qui migrent en chaîne sur une longue distance vers le bulbe olfactif où ils se réorientent avant leur insertion. Nous utilisons donc ce système car il est particulièrement adapté à l'étude de la migration de jeunes neurones, dans un contexte adulte ou postnatal, dans des conditions physiologiques ou après modification génétique.

Notre projet s'articule autour de deux axes.

1) Etude du rôle du cil primaire dans les nouveaux neurones en migration :

Le cil primaire est un petit organite sensoriel en forme de bâtonnet présent à la surface de la plupart des cellules eucaryotes qui joue un rôle majeur dans le développement du cerveau. Les nouveaux neurones en migration du cerveau adulte ainsi que ceux du cerveau postnatal assemblent un cil primaire. Par des expériences de délétion du cil, nous désirons analyser sa fonction au cours de la migration.

2) Etude de la signalisation AMPc dans les nouveaux neurones du cerveau normal et modèle du syndrome de l'X fragile :

Le Syndrome de l'X Fragile (SXF) est la première cause héréditaire de déficience intellectuelle. La signalisation par l'AMPc est altérée dans les cellules des patients atteints de SXF et dans le modèle murin de la maladie. La cascade AMPc est essentielle à de nombreux processus du cerveau en développement. Nous nous intéressons donc à la signalisation AMPc dans les neurones en migration du cerveau normal ou modèle de l'X Fragile.

Ce projet durera 5 ans. Le nombre total de souris utilisé sera 258. Elles seront issues de différentes lignées transgéniques et soumises à l'expérimentation soit au stade postnatal, soit à l'âge adulte.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre

minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien euthanasie par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le remplacement, nous désirons étudier la migration de neurones nouvellement générés dans le cerveau de la souris adulte et postnatale. Cette étude ne peut être réalisée que dans des conditions qui préservent l'environnement cellulaire très particulier des cellules migrantes ce que permet notre approche d'imagerie sur tranche de cerveau. Aucun modèle de culture cellulaire ne peut donc reconstituer cette complexité.

**9301** L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase initialement décrite dans le système vasculaire où elle assure la conversion du plasminogène en plasmine, laquelle permet la dégradation des caillots sanguins. Le tPA est également présent dans le parenchyme cérébral où il est exprimé par différentes cellules, en particulier les neurones. Des travaux ont rapporté de nombreux éléments en faveur d'une implication de cette protéase dans diverses fonctions du système nerveux central (SNC) parmi lesquelles la migration neuronale au cours du développement, la plasticité synaptique chez l'adulte et certains comportements. Plusieurs mécanismes d'action peuvent expliquer son rôle au niveau du SNC comme par exemple son interaction avec le récepteur N-méthyl-D-aspartate. L'ensemble de ces données permet de postuler que le tPA n'est pas seulement une protéase intervenant dans la cascade fibrinolytique mais qu'il est également un acteur polyvalent dans le parenchyme cérébral.

Au niveau clinique, des altérations des concentrations du tPA et de son inhibiteur (l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène de type 1, PAI-1) ont été observées lors d'études post-mortem de cerveaux de patients atteints de pathologies neurologiques (ex. maladie d'Alzheimer) caractérisées par des troubles cognitifs (en particulier de la cognition spatiale) et émotionnels (anxiété, dépression). De manière intéressante, ce type de déficits a également été observé chez des souris transgéniques déficientes pour le gène codant le tPA. Néanmoins, deux problèmes majeurs dus à l'invalidation globale du gène codant le tPA rendent complexe l'interprétation de ces études précliniques : 1) existence de potentiels biais neurodéveloppementaux liés à l'absence complète de la protéine, 2) absence de caractérisation des circuits cellulaires régissant ces comportements dépendants du tPA.

Notre projet de recherche vise donc à approfondir et étendre les connaissances actuelles sur l'implication du tPA dans les processus cognitifs spatiaux et anxieux. Pour ce faire, les conséquences fonctionnelles de l'invalidation du gène codant le tPA au sein de réseaux neuronaux spécifiques seront étudiées.

Cette étude est basée sur l'expérimentation animale et prend en compte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après.

- La souris est l'animal le plus utilisé dans la réalisation de modèles transgéniques pour l'étude fonctionnelle des gènes. Nous disposons pour cette étude d'un modèle original de souris transgénique, les souris tPA flox. L'invalidation du gène codant le tPA est réalisée chez cette souche de souris par l'injection intracérébrale de vecteurs viraux codant une endonucléase d'origine bactérienne : la recombinase Cre. Les souris tPA WT (wild-type) et tPA Null seront utilisées comme contrôles.

- Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que des tests comportementaux pour étudier les processus cognitifs spatiaux et anxieux. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est de 580.

- L'état de chaque souris sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. En revanche si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (perte de poids : >15% du poids initial, apathie...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole et euthanasié.

**9302** Ce projet de biologie cellulaire fondamentale concerne le lysosome, un compartiment interne de la cellule dont le rôle principal est de dégrader les constituants cellulaires obsolètes. Cette dégradation permet, d'une part, d'éviter que les macromolécules et les compartiments cellulaires vieillissants deviennent toxiques pour la cellule et, d'autre part, de recycler les composants simples pour fabriquer de nouvelles macromolécules ou alimenter le métabolisme. L'importance du lysosome est montrée par l'existence d'une cinquantaine de maladies génétiques, les maladies lysosomales, qui sont la conséquence de mutations de gènes impliqués dans la biologie du lysosome. Cette problématique est importante car on sait que les dysfonctions du lysosome au niveau du système nerveux central peuvent être associées à des pathologies graves, en particulier, neurodégénératives. Les protéines intralysosomales, qui réalisent la dégradation des composés obsolètes, sont relativement bien caractérisées. En revanche, les protéines de la membrane du lysosome restent peu étudiées bien que certaines d'entre elles soient mutées dans des pathologies humaines. Notre projet consistera à étudier l'activité de protéines membranaires du lysosome, en particulier des transporteurs qui évacuent les produits de dégradation à travers cette membrane et qui permettent leur recyclage dans la cellule. De nouveaux transporteurs du lysosome ont été récemment identifiés et notre objectif est de caractériser leur activité. Ces transporteurs seront étudiés dans des cellules de très grande taille, les cellules ovariennes (ovocytes) de la grenouille *Xenopus laevis*. Une fois prélevés, les ovocytes seront traités *in vitro* de façon à produire une quantité importante de transporteurs qui seront analysés par différentes approches biochimiques ou électrophysiologiques. Les ovocytes sont obtenus par prélèvement de fragments d'ovaires, après incision de l'abdomen de la grenouille préalablement anesthésiée afin d'éviter toute souffrance. Cette opération est bien tolérée, les complications sont très rares, cependant des points limites ont été introduits entraînant l'euthanasie anticipée si nécessaire. Les animaux seront surveillés de très près pendant les heures suivant la chirurgie. Cette opération est bien tolérée par l'animal qui présente très rarement des complications. Il n'y a pratiquement jamais d'infection, car les xénopes produisent des antibiotiques naturels. Cette caractéristique permet de programmer un maximum de six interventions par animal, avec un délai de récupération de 2 mois minimum entre chaque opération. Afin de réduire le nombre d'animaux, un même prélèvement d'ovaire servira à produire des ovocytes pour plusieurs types d'analyse. 85 animaux en 5 ans seront utilisés pour étudier une dizaine de transporteurs du lysosome. Le but de ce projet est d'identifier l'activité de nouveaux transporteurs pour mieux comprendre la biologie du lysosome, la physiopathologie des maladies associées, et éventuellement de proposer de nouveaux traitements.

**9303** Les manchots Adélie sont de bons indicateurs des changements survenant dans l'écosystème marin polaire. Notre modèle d'étude sera le manchot Adélie de Terre Adélie (Antarctique). Le projet s'intéressera à la sensibilité au stress des oiseaux faisant face à des conditions environnementales changeantes et au coût énergétique de la recherche alimentaire et à leur impact sur le succès de reproduction. Dans le cadre de ce projet, des manipulations des niveaux de corticostérone par des implants sous-cutanés seront réalisées (les valeurs délivrées par la pastille de corticostérone sont en dessous des valeurs maximales trouvées naturellement chez les manchots Adélie). D'autre part, des implants de transpondeurs seront réalisés pour identifier les oiseaux manipulés. Enfin, des injections d'eau doublement marquée (utilisant des isotopes stables), suivies de prises de sang seront réalisées pour mesurer le métabolisme énergétique des manchots.

Au total nous manipulerons 165 individus. Réduire : Le nombre d'oiseaux total est un compromis entre faisabilité sur le terrain et effectifs suffisants pour observer des changements significatifs des comportements comme nous l'ont montré des études préliminaires sur le sujet par notre équipe et qui utilisaient la même méthodologie.

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer l'espèce cible du projet puisqu'il s'agit d'une étude portant spécifiquement sur l'activité des manchots Adélie dans leur milieu naturel. Raffiner : toutes les précautions connues permettant de réduire l'impact de nos expériences sur les manchots sont scrupuleusement suivies. De telles manipulations ont déjà été réalisées par le passé et n'avons constaté aucun effet négatif sur la santé ou la survie. Le temps de manipulation de l'oiseau est limité au minimum (pas plus de 15 min), et des précautions sont prises pour diminuer le stress dû à la

capture (cagoule masquant la vue, travail dans une zone calme) et la zone de nidification de l'oiseau est protégée.

**9304** Ce projet consiste à mettre en évidence le mode d'action d'une nouvelle approche de contrôle du développement des tumeurs chez la souris.

Pour cela, 1080 souris au maximum seront utilisées sur une période de 3 ans afin d'établir l'efficacité et le mode d'action de 2 composés X et Y sur le développement d'une tumeur. Ce projet est découpé en 2 expériences successives.

Dans un premier temps, la voie de délivrance du traitement ainsi que son mécanisme d'action seront étudiés avec les composés X et Y ainsi que 2 versions optimisées pour chaque composé. Pour cela 990 souris seront utilisées. Dans la deuxième expérience 90 souris seront utilisées et utiliseront une des voies d'injection et le composé optimisé (dérivé du composé X) les meilleurs déterminés dans l'expérience précédente.

Cette expérimentation nécessitera au maximum l'utilisation de 1080 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation des composés sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Les animaux sont suivis quotidiennement à partir de l'injection des cellules tumorales et les tumeurs mesurées tous les jours à partir du moment où elles sont visibles. Si les points limites sont atteints les animaux seront euthanasiés sans délai.

**9305** Les éleveurs de volailles sont amenés à soigner des animaux malades ou à utiliser des médicaments vétérinaires de manière préventive. Pour les poules pondeuses, des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits dans les œufs destinés à la consommation humaine.

Ces études permettent de fixer le temps pendant lequel les œufs doivent être jetés et non consommés suite à l'administration d'un médicament vétérinaire. Il s'agit d'études réglementaires *in vivo* de sécurité alimentaire.

La procédure consiste à l'administration du médicament dans les conditions normales d'utilisation. Elle est suivie par le recueil des œufs et par l'analyse du (des) produits dans ces œufs. Une courbe d'élimination peut ainsi être tracée et permet de définir la date à laquelle les limites maximales acceptables de résidus sont atteintes.

Avant et possiblement après l'administration du médicament, des prises de sang seront réalisées afin de suivre la santé de l'animal et/ou la concentration du principe actif dans l'organisme.

Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu pour que les animaux puissent exprimer leur comportement normal, perchoir, sciure...). Une évaluation quotidienne de l'état de santé général de l'animal sera réalisée pour une détection précoce de signes cliniques anormaux et une prise en charge rapide des animaux. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention.

L'hébergement s'effectue en individuel afin de pouvoir collecter et identifier les œufs de façon individuelle. Une attention particulière est portée à l'enrichissement du milieu pour que les animaux puissent exprimer leur comportement normal (perchoir, sciure.)

Le but du projet est de tester 10 formulations ; ces études sont généralement menées sur des groupes de 15 poules pondeuses par formulation (soit un total de 150 animaux) sur 5 ans. Deux études par an sont programmées en moyenne, soit un total de 30 animaux utilisés par an.

**9306** Le carcinome hépatocellulaire (CHC), troisième cause de mortalité par cancer dans le monde, représente un problème majeur de santé publique pour lequel les options thérapeutiques sont limitées : bien que les tumeurs à un stade précoce puissent être traitées de façon curative en utilisant des approches chirurgicales, elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé, où les patients ne peuvent bénéficier que d'une option palliative. Ainsi, une thérapie qui soit bien tolérée, peu coûteuse et qui présente un ratio bénéfice-risque acceptable fait défaut.

L'objectif global du projet Thera-HCC est de développer des stratégies innovantes de traitement du CHC basées sur l'administration de nano vecteurs délivrant des ARN interférents (siRNA) qui cibleront des voies moléculaires impliquées dans la carcinogénèse

Des nano vecteurs types SiRNA (particules d'une taille inférieure à 100 nm, soit 0,1 millièème de millimètre) ont été synthétisés comme outils diagnostiques et thérapeutiques pour le traitement du carcinome hépatocellulaire. Plusieurs nano vecteurs candidats seront tout d'abord testés in vitro, seuls ceux ayant répondu aux critères in vitro de non-toxicité et d'efficacité seront évalués par la suite in vivo. Ces études in vitro nous permettent ainsi de REMPLACER une grande partie des études in vivo par des études n'impliquant pas d'animal.

Des études antérieures chez des souris immuno-déficientes ont été réalisées dans notre institut pour tester ces nano vecteurs. Ces études ont montré des résultats encourageants sur la réduction de la taille du carcinome une fois injecté directement à l'intérieur de la tumeur.

L'objectif de ce projet est d'augmenter les effectifs par rapport à l'étude précédente pour tester d'autres nano particules candidates afin d'évaluer leur comportement, leur répartition, leur efficacité sur une tumeur vascularisée impossible à reproduire in vitro. Ainsi pour ce projet nous tachons à réduire au maximum le nombre d'animaux pour cela 120 souris seront utilisées pour tester ces nano vecteurs.

De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (antalgie systématique) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie générale, imagerie non invasive)

**9307** Afin de préserver le bien-être des animaux, les personnes amenées à réaliser des gestes sur des animaux vivants doivent être formées et entraînées. Ainsi le geste bien maîtrisé ne provoquera qu'une gêne minimale à l'animal. Au sein de notre établissement, un programme de formation des nouveaux entrants et des personnels qui ressentent le besoin de se remettre à jour est établi. Le but de ce projet est de former aux méthodes d'administration de solutés utilisées dans l'établissement des personnes habilitées à l'expérimentation animale. Les voies d'administration enseignées seront : l'injection sous cutanée ; l'injection intrapéritonéale ; l'injection dans le sinus rétro-orbital ; l'injection intraveineuse dans les veines de la queue ; l'injection intraveineuse dans les veines jugulaires ; le gavage per os dans l'œsophage. Cette formation pratique est dispensée par une personne experte. Tout au long de cette formation, une attention particulière est apportée au respect des 3 R : Remplacer ; Réduire ; Raffiner.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de l'animal pour cet apprentissage car la manipulation des êtres vivants demande de la maîtrise qui ne peut s'acquérir qu'en pratiquant avec l'animal vivant.

Réduire : Ce projet vise à former les expérimentateurs aux gestes de base pratiqués au sein de notre unité de recherche. Avant la formation, les besoins sont analysés et la personne ne sera formée que pour les gestes qui lui seront nécessaires. Pour limiter le nombre d'animaux nécessaire, le geste est d'abord expliqué à l'aide d'un schéma. Pour la partie pratique nous n'utiliserons que des animaux nés dans notre animalerie qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets et destinés à être euthanasiés, par exemple parce qu'ils sont nés avec un génotype non souhaité. Le nombre moyen d'animaux nécessaire par apprenti est estimé. Ce nombre sera réduit si la maîtrise du geste est acquise avant d'avoir utilisé tous les animaux prévus.

Raffiner : Avant d'expérimenter sur des animaux vivants, le geste est expliqué par le formateur, puis l'apprenant observe des personnes expertes dans la réalisation de ces gestes. Ensuite tous les gestes qui le permettent seront réalisés avec des animaux anesthésiés. Le nombre d'essais sur les



animaux est limité de 2 à 4 selon les techniques, le temps est limité à 5 min et les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure afin d'éviter tout mal-être dû à la maladresse des apprenants. L'euthanasie des animaux sera réalisée par le formateur. Une estimation de 4000 souris sur 5 ans est établie pour former 50 personnes à 6 gestes différents.

**9308** 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, la découverte de marqueurs spécifiques et l'utilisation de souris transgéniques a permis la mise au point de stratégies permettant d'isoler les cellules satellites, les cellules souches musculaires, responsables de la régénération et de la réparation du muscle squelettique. Cependant, des travaux récents ont montré que au sein du muscle squelettique, les cellules satellites ne sont pas les seules cellules capables de participer à la régénération musculaire, mais que d'autres cellules résidentes dans le muscle pourraient y contribuer. L'étude des différentes populations cellulaires résidentes dans le muscle squelettique devient fondamentale d'une part pour essayer de comprendre le complexe mécanisme de la régénération musculaire et d'autre part pour améliorer les approches correctrices de thérapie cellulaire pour le traitement des maladies génétiques neuromusculaires.

L'objectif de ce projet est d'étudier le comportement in vivo de cellules interstitielles musculaires (préalablement caractérisées in vitro) distinctes des cellules satellites isolées à partir de souris en évaluant leur comportement au cours de la régénération musculaire.

Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection. 30 souris immunodéficientes et immunodéficientes/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, réduisant ainsi le nombre des souris utilisé de la moitié. Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique (Buprénorphine). 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.

**9309** L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, causé par un infarctus (accident dit ischémique) ou une hémorragie (accident dit hémorragique) au niveau du cerveau, empêchant un apport sanguin suffisant vers ce dernier. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale, comme l'IRM (technique de choix). Le traitement le plus récent et le plus prometteur de l'accident ischémique semble être la thrombectomie, visant à détruire le caillot responsable de l'occlusion et ainsi restaurer l'apport sanguin (perfusion) du cerveau. Mais cette reperfusion, bien que bénéfique, entraîne également des lésions supplémentaires aux cellules. Le traitement des lésions de reperfusion est donc crucial car il réduit les lésions cellulaires et l'inflammation.

La preuve d'efficacité in vivo est indispensable à la poursuite du développement de nouvelles thérapeutiques. Afin de valider l'efficacité d'un nouveau traitement de l'AVC ischémique et avant de le tester chez l'Homme, il est nécessaire de l'évaluer avec un modèle animal pertinent. La majorité des essais cliniques a échoué au moment de la translation clinique en raison des trop grandes différences entre le modèle rongeur de l'AVC et la réalité clinique. Le modèle primate est donc un modèle de choix pour ces études. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiopathologiques chez l'Homme en réponse à un AVC.

Ce projet prévoit donc de mettre en place un modèle d'AVC ischémique avec caractérisation par imagerie TEP/IRM chez le macaque afin d'évaluer, dans une étude ultérieure, l'efficacité d'une molécule d'intérêt ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de l'infarctus du myocarde.

Ce projet prévoit au maximum 4 animaux qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux.

Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par un neuroradiologue interventionnel expérimenté. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

**9310** De nos jours, le diagnostic des tumeurs consiste en une analyse histologique (observation au microscope) de prélèvements tissulaires associés à une IRM (Imagerie par résonance magnétique). Même si ces deux méthodes font référence dans la pratique hospitalière, elles ne sont pas dénuées d'inconvénients. En effet, l'analyse de tumeurs par l'histologie ne donne pas d'information dynamique, est opérateur dépendant et se limite à une fraction non-représentative de la pathologie. De plus, le prélèvement répété lors du suivi d'un patient n'est cliniquement pas réalisable. Le suivi local de l'hétérogénéité des tumeurs cérébrales reste aujourd'hui un défi. Dans ce contexte, l'imagerie médicale et notamment l'imagerie par IRM s'est fortement développée. Au cours de la dernière décennie, les développements méthodologiques en IRM ont permis de cartographier in vivo des paramètres structurels et fonctionnels caractérisant les tumeurs cérébrales au niveau cellulaire et vasculaire (imagerie du volume et du débit sanguin, de la taille des vaisseaux ...). Bien que certains de ces paramètres, soient déjà utilisés en routine clinique, aucun ne s'est imposé pour remplacer l'analyse histologique dans la classification des tumeurs cérébrales. Une alternative à l'utilisation de l'IRM classique est d'exploiter la richesse des acquisitions IRM multiparamétrique afin de créer des images composites présentant des informations similaires aux analyses histologiques.

A l'heure actuelle, l'imagerie par rayons X est très peu utilisée lors de la prise en charge de patients porteurs de tumeur car elle n'offre que peu de contraste des tissus « mous ». Cependant, des développements récents et très prometteurs de l'imagerie rayon-x dites « par contraste de phase » ont démontré dans d'autres pathologies qu'il était possible d'obtenir des informations pertinentes sur des tissus de faible densité. L'apport de cette nouvelle technologie d'imagerie n'a pour l'instant jamais été évalué sur des tumeurs.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer ces deux techniques innovantes d'imagerie in-vivo que sont l'IRM multiparamétrique et l'imagerie rayon-x par contraste de phase et de les valider comme marquages tumoral. L'objectif secondaire est d'étudier l'origine des contrastes obtenus par ces deux nouvelles méthodes en les comparant avec des données d'histologies.

Cette étude menée sur 96 rats portant une tumeur cérébrale (4 modèles) mettra en œuvre un protocole unique d'imagerie multimodale pour lequel la croissance tumorale de chaque modèle sera suivie par imagerie in-vivo par IRM multiparamétrique. Au dernier jour d'imagerie, les animaux seront imagés par IRM multiparamétrique puis par imagerie par rayon x. Après euthanasie des animaux, les cerveaux seront imagés par les deux modalités et analysés par histologie 2D ou 3D après clarification tissulaire.

Dans le cadre de ce projet, nous avons estimé la possibilité de remplacer, réduire et raffiner nos expériences selon la règle des 3R.

Remplacement : Pour les modèles de tumeurs cérébrales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant pour un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, aucun modèle alternatif ne permet encore de reproduire en globalité la complexité de ces pathologies.

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

Raffiner : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**9311** L'un des enjeux majeurs en écologie est de comprendre la réponse des organismes aux variations environnementales. Dans cette perspective, la clarification des mécanismes proximaux est une étape indispensable pour prédire des patrons écologiques généraux comme l'utilisation de l'habitat ou la distribution des espèces. Les espèces terrestres ectothermes sont soumises aux contraintes de leur environnement thermique et hydrique. Cependant, les compromis liés à la disponibilité en eau demeurent relativement peu considérés, bien que l'eau soit une ressource capitale pouvant être limitante en particulier pendant la gestation chez les espèces vivipares. Nous avons récemment démontré que la régulation de la balance hydrique joue un rôle clé dans les compromis physiologiques et comportementaux de la mère par rapport aux besoins de ces jeunes chez une espèce commune de lézard, le lézard vivipare (*Zootoca vivipara*). Cette étude était basée sur une simulation expérimentale d'une restriction hydrique en milieu de gestation. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'ajustement de la physiologie, du comportement et de l'effort reproducteur des femelles adultes vis à vis de la disponibilité en eau tôt ou tard dans la gestation. Pour ce faire, nous étudierons les effets d'une restriction d'eau modérée (1 seul arrosage par jour contre 3 arrosages par jour) pendant deux semaines tôt dans la gestation (mai) ou tard dans la gestation (juin) sur les niveaux de déshydratation, de stress hormonal, de dépenses métaboliques et sur le comportement de thermorégulation pendant la gestation puis sur l'effort reproducteur (nombre et caractéristiques de jeunes). Dans le but de tester les contraintes induites par la gestation tout en tenant compte des fortes différences entre individus, nous utiliserons un effectif élevé de femelles adultes gestantes ( $n = 120$ ) que l'on comparera à un groupe de mâles adultes ( $n = 80$ ). Nous minimiserons les effectifs en limitant l'étude sur une seule classe d'âge adulte (réduction), nous proposerons des mesures de raffinement des protocoles (antalgie) et nous enrichirons les cages des animaux en éléments de microhabitats. Les jeunes nés en captivité seront ensuite relâchés avec leur mère et recapturés pendant leur première année de vie afin de quantifier leur croissance et leur survie juvénile. Le lézard vivipare est particulièrement pertinent pour tester nos hypothèses compte tenu de sa forte dépendance aux zones humides en conditions naturelles. Notre hypothèse générale est que les conditions hydriques confrontent les femelles gestantes à des compromis physiologiques plus importants que les mâles et en particulier tard dans la gestation. Un conflit d'allocation de l'eau entre la mère et ses jeunes sera donc attendu si la restriction hydrique a lieu tard dans la gestation.

**9312** De nos jours, les études précliniques de pathologie cérébrale utilisent majoritairement comme outils d'imagerie, l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et l'analyse au microscope des cellules (immunohistochimie) sur des modèles rongeurs (rats et souris). L'IRM est principalement utilisée comme technique non invasive de cartographie anatomique sur l'ensemble du cerveau. Alors que l'immunohistochimie permet d'obtenir la localisation des composants cellulaires d'intérêt, mais uniquement localement et de manière invasive. Dans ce contexte, de nombreux atlas du cerveau de rat ou de souris ont vu le jour permettant d'associer les images cérébrales de ces deux techniques à des structures anatomiques de référence. Ces atlas de cerveaux « normaux » sont extrêmement précieux pour venir positionner des pathologies telles que les maladies neurodégénératives. Ces dernières années, les techniques d'imageries se sont largement développées modifiant drastiquement le type de données disponibles pour l'exploration du système nerveux central. En IRM multiparamétrique, les développements méthodologiques permettent maintenant de cartographier in vivo et simultanément des paramètres structurels et fonctionnels caractérisant les tissus cérébraux au niveau cellulaire et vasculaire (imagerie du volume et du débit sanguin, de la taille des vaisseaux...). L'imagerie rayon-x dites par « contraste de phase » est également une technique émergente qui allie un grand niveau de détail à un bon contraste aux tissus mous. Il est ainsi possible d'obtenir une représentation structurelle globale du cerveau pour par exemple, visualiser le réseau

vasculaire et les fibres nerveuses cérébrales. Les analyses immunohistochimiques ont aussi été améliorées ces dernières années. L'introduction de techniques de numérisation de coupes entières par scanner de lames ou de clarification tissulaire permet maintenant d'analyser la distribution cellulaire dans l'ensemble du volume cérébral.

A ce jour il n'existe pas d'atlas de cerveaux de rongeurs regroupant les structures anatomiques connues et l'information apportée par ces nouvelles techniques d'imagerie que sont l'IRM multiparamétrique, l'immunohistochimie 3D et la tomographie rayon-x par contraste de phase. Ce projet a donc pour but de générer un atlas 3D du cerveau de souris et de rats sains fusionnant des données anatomiques, fonctionnelles (par IRM multiparamétrique), une représentation structurelle fines par imagerie rayon-x ainsi que différents marquages cellulaires. Cet outil d'exploration du cerveau de rats et de souris en développement sera ouvert librement à l'ensemble de la communauté scientifique, pouvant servir de référence dans l'étude de pathologie cérébrale ou toute autre étude du système nerveux central.

Cette étude menée sur 72 rats et 72 souris sains, mettra en œuvre un protocole unique d'imagerie multimodale. L'ensemble du volume cérébral sera imagé une première fois in-vivo par IRM multiparamétrique et par imagerie de contraste de phase. Après euthanasie des animaux, les cerveaux seront imagés une deuxième fois par les deux modalités et analysés par histologie 2D ou 3D après clarification tissulaire.

Dans le cadre de ce projet, nous avons estimé la possibilité de remplacer, réduire et raffiner nos expériences selon la règle des 3R.

Remplacement : L'objectif du projet étant de créer une base de données représentative de la complexité du cerveau de rat et de souris. Il nous est impossible de remplacer l'animal vivant pour un modèle cellulaire ou par une simulation informatique. En effet, aucun modèle alternatif ne permet encore de reproduire en globalité la complexité du cerveau.

Réduction : Le nombre d'animaux a été déterminé par une méthode statistique et par une étude bibliographique des atlas de cerveaux de rats et souris, de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffiner : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**9313** **Projet :** Les maladies chroniques du foie sont très fréquentes. D'après les estimations, elles affectent 2,8% de la population générale en France et sont responsables de plus d'un million de décès par an dans le monde. La stéatose métabolique (communément appelée stéatose non-alcoolique[NAFLD]) est associée à la surcharge pondérale et au diabète de type 2. C'est aujourd'hui la maladie du foie la plus fréquente, avant même les hépatites virales chroniques ou la consommation excessive d'alcool. La mort des cellules du foie est ce qui conduit à la progression de toutes les maladies du foie vers la cirrhose et le cancer du foie. L'hypothèse que nous formulons dans ce projet est que la nécroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire programmée induisant de l'inflammation et contrôlée par la kinase RIPK3, est impliquée dans la progression des maladies du foie, et qu'une nouvelle stratégie thérapeutique dans ces maladies consisterait à bloquer la nécroptose.

Le projet vise à identifier la contribution de la nécroptose à la stéatose métabolique et une maladie biliaire rare, la cholangite sclérosante primitive (CSP), deux maladies pour lesquelles il n'existe pas à ce jour de traitement efficace, et qui ciblent des types cellulaires différents du foie. Pour ce faire, nous combinerons une recherche sur des modèles de stéatose métabolique et de CSP chez des souris génétiquement modifiées pour inhiber les voies de la nécroptose dans différents types cellulaires (hépatocytes, cholangiocytes et macrophages) avec l'analyse de "souris sauvage" (WT) obèses traitées avec des inhibiteurs de la nécroptose que nous avons récemment identifiés.

La perspective est de développer de nouveaux traitements pour prévenir la mort des cellules du foie et par conséquent réduire le développement des complications de type cirrhose ou cancer chez les patients atteints de maladies hépatiques.

Type d'animaux : Souris transgéniques invalidées pour le gène d'intérêt dans différent contexte.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 280 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance de par l'analyse des données générées en continue. De plus, une démarche en constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des procédures décrites dans ce projet.

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

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

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

**9314** L'ischémie-reperfusion (IR) mésentérique associe une composante vasculaire d'ischémie et d'activation endothéliale et une composante digestive. L'hypoperfusion de la muqueuse intestinale est responsable de lésions épithéliales pouvant aller jusqu'à la rupture de la barrière épithéliale. L'absence d'un rétablissement rapide de la perfusion digestive peut conduire à une nécrose intestinale irréversible puis à une péritonite, voir une septicémie. Un diagnostic et un traitement de revascularisation précoces peuvent permettre une réversibilité des lésions.

Cependant, la ré-oxygénation brutale de la muqueuse digestive peut paradoxalement aggraver les lésions épithéliales et vasculaires par un mécanisme d'explosion oxydative, d'afflux de polynucléaires neutrophiles et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

La translocation bactérienne sanguine associée à l'IR augmente l'intensité de la réaction inflammatoire, en particulier pulmonaire, faisant du tube digestif un véritable foyer infectieux conduisant à la défaillance multi-viscérale. Plusieurs thérapeutiques ont déjà été expérimentées (reperfusion séquentielle, molécules anti-oxydantes, anti-inflammatoires, Bêtabloqueurs) avec une efficacité hétérogène sur la réduction des lésions tissulaires. Cependant aucun de ces candidats thérapeutiques n'est aujourd'hui utilisé en pratique clinique courante.

Le CD31 est une glycoprotéine transmembranaire présente constitutivement à la surface des cellules endothéliales, des leucocytes. La liaison homophile CD31-CD31 impliquant ces cellules permet leur inactivation par inhibition mutuelle. Le clivage du CD31 à la surface des leucocytes entraîne une perte de cette inhibition et engendre une activation endothéliale et leucocytaire délétère, avec passage tissulaire des neutrophiles.

Nous utiliserons un analogue peptidique du CD31, capable de rétablir la signalisation inhibitrice induite par le CD31 même après son clivage.

Selon nos hypothèses, le clivage du CD31 à la surface des leucocytes contribuerait à leur activation, favorisant les lésions épithéliales digestives liées à l'IR mésentérique, et le rétablissement de la fonction de pacification du CD31 par son analogue peptidique pourrait limiter ces lésions.

Par ailleurs, une étude précédente a permis d'établir que la perfusion de cet analogue peptidique du CD31 en préventif avant le clamage de l'artère mésentérique supérieure chez le rat suivi d'une période de reperfusion de courte durée permettait de réduire les lésions épithéliales digestives d'IR.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'analogue peptidique du CD31 administré en curatif lors de la reperfusion de l'artère mésentérique supérieure, dans la limitation des lésions digestives tardives liées à l'ischémie reperfusion. D'autre part, nous évaluerons le retentissement

systémique et à distance de l'inflammation liée à l'IR mésentérique et le potentiel thérapeutique de l'analogue peptidique de CD31 pour limiter cette inflammation généralisée.

Nous utiliserons le même modèle que décrit dans l'expérience précédente avec des périodes d'ischémie de 30 minutes à 1 heure chez des animaux anesthésiés et analgésiés avec une période de reperfusion de 24 heures, au bout de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

Ce projet est construit en intégrant au maximum la préconisation des 3R de Russel et Burch : Remplacer et Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans les protocoles expérimentaux. Des points limites ainsi qu'une étude statistique pour le calcul du nombre de sujets nécessaires ont été définis afin de réduire au minimum le nombre d'animaux et éviter toute souffrance inutile.

Raffinement : prise en charge de la douleur per et post-opératoire par de la Buprénorphine en sous-cutané, points limites précis (selon une surveillance à l'aide d'une fiche détaillée), entraînant l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'expérience.

Remplacement : ne peut pas être fait ici, car le modèle animal est indispensable afin de déterminer l'effet curatif de l'analogue peptidique de CD31 dans l'I/R mésentérique.

Réduction : afin de limiter le nombre d'animaux à inclure, à partir de l'étude précédente, nous avons calculé la taille des groupes en fonction du risque d'erreur de 5% et de la puissance de 80% pour détecter une diminution de 30% de la hauteur épithéliale et de la densité en cellules gobelets : 10 rats par groupe seront nécessaires, 60 rats au total.

L'intérêt de ce nouveau projet expérimental est de s'inscrire dans le développement d'une thérapeutique applicable dans l'IR mésentérique chez l'homme, pour laquelle il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique. Ainsi, le point fort de ce projet est de tester cet analogue peptidique de CD31, administré en curatif et non plus en préventif, ce qui correspond mieux aux réalités cliniques chez l'homme, chez qui le début de l'ischémie mésentérique n'est quasiment jamais prévisible.

**9315** Le contrôle de la communication entre les neurones est nécessaire pour adapter les réponses des neurones aux modifications de l'environnement. La communication neuronale se fait au niveau des synapses, qui sont des structures spécialisées où un neurone contacte un autre neurone dit post-synaptique pour induire une réponse. Certaines synapses permettent l'activation des neurones et sont dites excitatrices, d'autres préviennent cette activation et sont dites inhibitrices. Ces dernières années, nous avons montré que des macrophages présents dans le cerveau, les microglies, participent de manière importante à la régulation des synapses excitatrices et inhibitrices.

Nos études visent à mieux caractériser les régulations des synapses inhibitrices par la microglie et aussi à en comprendre les répercussions physiologiques. En particuliers, il est connu que les synapses inhibitrices sont importantes pour la physiologie sur sommeil. Nous examinerons si les régulations des synapses inhibitrices par les microglies que nous avons mises en évidence sont impliquées dans la régulation du sommeil.

Dans les lignées cellulaires, les interactions entre neurones et microglies ne sont pas conservées et nous devons utiliser des systèmes plus intégrés. Les études des interactions synapses microglies se feront sur des cultures d'explants de cerveau ou sur des tranches de cerveau dans lesquels les interactions cellulaires complexes sont conservées. Les études sur le sommeil devront se faire sur des animaux.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : Réduction - Les cultures d'explants que nous utiliserons permettent de réduire considérablement le nombre de souris utilisées puisqu'une seule souris permet de réaliser plusieurs essais. Raffinement - Nous réduirons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettrons en œuvre sont bien établies et n'induisent pas de douleur d'angoisse ou de stress, et nous appliquerons des soins pré- et post-opératoires quand cela sera utile. Remplacement - Il n'existe pas de méthode alternative fiable pour remplacer les cultures d'explants pour étudier la fonction synaptique, et le sommeil ne peut s'étudier que sur des animaux entiers. Nous serons néanmoins vigilants quant au développement de méthodes alternatives pendant la durée de ce projet.

Nous prévoyons d'utiliser environ 1500 souris pendant les 5 années de ce projet.

**9316** Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3 (oméga 3) sont les composants principaux des membranes cellulaires de tous les organismes, ce qui leur confère un rôle essentiel dans le maintien des fonctions physiologiques. Pourtant, ils ne sont que très peu synthétisés par les organismes supérieurs, et doivent être apportés par la nourriture. En milieu naturel, ils sont principalement produits à la base du réseau trophique, par les microalgues marines. En modifiant un certain nombre de paramètres physico-chimiques comme la température, le pH, ou le taux d'oxygénation, le changement global entraîne une modification de la physiologie et de l'assemblage des communautés de microalgues, entraînant une baisse de la production en oméga 3 à disposition pour ses consommateurs. Les conséquences d'une telle modification sur la composition, le fonctionnement des membranes cellulaires et en cascade sur la physiologie des organismes supérieurs sont largement inconnues.

En raison de son comportement de brouteur de microalgues benthiques (c'est-à-dire fixées au fond), le mulot assure une grande partie du couplage benthos/pelagos, c'est-à-dire du transfert des oméga 3 du sédiment (microalgues benthiques) vers la colonne d'eau (le pelagos). De plus, par ses prédateurs comme le bar ou le maigre, hautement consommés par l'homme, le mulot constitue une pièce centrale dans le transfert des oméga 3 vers le reste des maillons trophiques, et vers l'Homme. Ainsi, une diminution de la production en oméga 3 par les microalgues attendue avec le changement global est susceptible d'entraîner une modification de la composition et donc de la fonctionnalité des membranes cellulaires du mulot. En cascade, cela est susceptible d'impacter ses performances physiologiques comme la performance de locomotion, son métabolisme ou sa fonction cardiaque, et peut avoir des conséquences sur l'efficacité de ce couplage benthos-pelagos. Or, de la bonne efficacité de ce couplage dépendent (1) le fonctionnement global de l'écosystème et (2) les biens et services associés, comme l'exploitation d'espèces prédatrices du mulot, et assurant le transfert d'oméga 3 vers l'Homme.

L'objectif de ce projet est de tester les effets d'une diminution de la disponibilité en oméga 3 liée au changement global, sur l'efficacité de ce couplage benthos/pelagos en mesurant expérimentalement la capacité de fuite du mulot face à un prédateur artificiel.

Pour cela, 34 mulots *Liza aurata* prélevés en milieu naturel et préalablement acclimatés aux conditions de laboratoire seront conditionnés (bacs 300 L d'eau de mer filtrée, circuit fermé), pendant 3 mois, avec deux aliments artificiels (granulés fabriqués expérimentalement) contrastés en oméga 3 LC (n=17 individus par condition). Ils seront nourris à raison de 2% de leur biomasse par jour. La durée de nourrissage de trois mois correspond au temps nécessaire à l'incorporation des acides gras présents dans l'aliment dans les membranes cellulaires des individus. Pendant cette phase de conditionnement, il s'agira (1) d'estimer le taux de croissance spécifique par biométries mensuelles sur la totalité des poissons préalablement anesthésiés au MS-222 (0.1 g l<sup>-1</sup>); (2) d'étudier expérimentalement la capacité de fuite des individus face à un prédateur artificiel. Pour cela, tous les poissons seront testés individuellement dans un bac de 300 l d'eau de mer dans lequel un prédateur sera simulé expérimentalement par un tube PVC simulant un oiseau plongeant dans l'eau. Une caméra à haute vitesse sera utilisée pour mesurer (a) la réactivité (i.e. pourcentage d'individus répondant au stimulus par une réponse de fuite), (b) la direction de la fuite, (c) la latence, (d) et la fréquence de ventilation. En fin d'expérience, les poissons seront euthanasiés par une forte dose d'anesthésiant (MS-222 2 g.L<sup>-1</sup>) pour vérifier la concordance entre leur composition lipidique musculaire, cardiaque et cérébrale et celle de leur nourriture.

Le remplacement des poissons par d'autres animaux, ou le remplacement des mulots par un autre groupe de poisson, ou par des organismes non vivants n'est pas possible dans cette étude car l'objectif est de mesurer spécifiquement la réponse de fuite des mulots, qui constituent un groupe de fort intérêt écologique dans la région étudiée. Le raffinement sera assuré du prélèvement en milieu naturel jusqu'à l'euthanasie car les animaux seront surveillés quotidiennement et si un comportement anormal était observé comme l'apathie, la prostration ou au contraire une excitation excessive, ou encore le refus de se nourrir, les individus concernés seraient transférés dans un aquarium où il recevrait une nourriture enrichie (avec de la vitamine C par exemple). Les individus concernés ne seraient pas utilisés avant au moins une semaine pour les tests effectués afin d'éviter des biais éventuels sur les réponses de fuite. Enfin, la réduction du nombre d'individu, c'est à dire le nombre d'individus retenus, i.e. 17 par condition expérimentale correspond au nombre minimal d'animaux

nécessaires pour obtenir un taux de réponse de fuite exploitable statistiquement. Nos méthodes de travail et de manipulation des animaux, en l'occurrence ici des espèces de téléostéens, sont basés sur un savoir-faire et des compétences acquises depuis plus de 15 ans.

**9317** La mise en place de cette plateforme d'étude du comportement chez la souris permet d'explorer aussi bien les fonctions comportementales de base que les fonctions cognitives complexes grâce à des paradigmes comportementaux adaptés. La plateforme est uniquement centrée sur le modèle souris qui offre les plus larges potentialités pour l'application des méthodes modernes d'ingénierie génétique et d'étude expérimentale du comportement. Ce plateau technique a pour vocation de permettre la mesure des comportements basiques et des paramètres physiologiques de base (activité motrice, force musculaire, coordination motrice, fatigue), de permettre l'évaluation des fonctions cognitives (activité exploratoire, anxiété, attention, motivation) et des capacités d'apprentissage et de mémoire (mémoire sociale, spatiale, associative...). Ce plateau d'analyse du comportement chez la souris est ouvert à la communauté scientifique et a comme principales missions dans le domaine de l'exploration comportementale, de proposer, de développer et d'adapter des technologies innovantes et compétitives pour répondre aux besoins des utilisateurs, que ce soit dans le cadre de recherches fondamentales ou biomédicales.

Ce plateau s'adresse à tous les chercheurs collaborant pour lier les gènes, les maladies et les traitements avec le comportement et ce dans de nombreuses pathologies (physiologiques, neurologiques, neurodégénératives ou troubles psychiatriques). Actuellement, les recherches en physiologie et/ou biologie intégrative exploitent la connaissance des génomes afin de décortiquer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les grandes fonctions biologiques. L'analyse comportementale de ces animaux génétiquement modifiés, dont le nombre va croissant, nécessite des compétences spécifiques et des moyens importants. De même, le rôle de nouvelles molécules spécifiques provenant de la pharmacologie classique voir de la génomique ou de la protéomique doivent impérativement être testé in vivo afin de connaître leurs actions sur le comportement et de rechercher d'éventuel effets secondaires sur le comportement des animaux.

De nombreux laboratoires de recherche à la fois publics et privés, et les EPST comme les sociétés privées locales sont fortement intéressées par une offre de prestations comportementales. Nous avons donc voulu développer les outils pour réaliser l'ensemble des explorations comportementales chez la souris et ces outils ont été regroupé au sein d'un même plateau technologique de procédures comportementales.

Le plateau veut proposer d'être le garant éthique dans différentes expériences comportementales classiques proposées sur le plateau. Cette autorisation d'expérimenter concernera uniquement les animaux pris en charge dans l'établissement utilisateur. L'intérêt de cette demande est de simplifier les démarches des concepteurs d'expériences, mais également d'éviter d'avoir à demander une autorisation d'expérimentation à chaque expérience pour une procédure unique, ce qui devrait non seulement faire gagner beaucoup de temps mais également qui devrait éviter une surcharge de travail (parfois très répétitif) pour le comité d'éthique.

Cependant, le plateau ne se portera garant éthiquement que sur des souris n'ayant subi aucune modification génétique pouvant entraîner une gêne ou un handicap particulier pour la souris. Il en est de même pour les souris recevant un traitement pharmacologique pouvant engendrer des modifications comportementales importantes (stress ou autres.). Donc, avant d'accepter d'effectuer des expériences comportementales sur un groupe de souris, nous allons vérifier que les souris ne présentent aucun stress particulier et ni gêne ni handicap. Pour cela, nous allons en premier interroger les concepteurs sur leur modèle et donc sur ces risques potentiels. Puis, tous les groupes de souris seront examinés par notre vétérinaire référent qui fait partie du SBEA. Tous les signes de mal-être seront examinés (postures, texture du poils, poids anormal.) par le vétérinaire et seuls les animaux en parfaite santé et sans aucun signe de stress ou de handicap seront pris en charge par le plateau. Dans le cas contraire, nous demanderons aux concepteurs d'effectuer une demande d'expérimentation propre pour leurs animaux.

Il est bien entendu très difficile voire impossible de prévoir le nombre de clients par an et l'évolution de ce nombre sur les 5 prochaines années, et donc de prévoir le nombre exact d'animaux que nous allons utiliser, ainsi que les génotypes des souris et les traitements effectués. Le nombre de groupes



sera fonction du projet qui sera confié au plateau mais le nombre de souris par groupe est généralement compris entre 10 et 12. Basé sur une estimation de l'utilisation actuelle du plateau, le nombre total de souris testées pourra être compris entre 180 et 250 souris par an, soit 900 à 1250 animaux sur 5 ans.

Conformément aux exigences de remplacement, de réduction, le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre d'animaux observés. La standardisation des procédures permettra d'améliorer la reproductibilité des résultats, ce qui pourrait également conduire à une réduction supplémentaire du nombre d'animaux.

De plus, l'un des objectifs prioritaires du plateau d'analyse du comportement de la souris consiste à raffiner les conditions expérimentales en se basant principalement sur une observation accrue des animaux pendant le déroulement des procédures comportementales. Tout signe de stress ou de souffrance de l'animal pendant une procédure sera contrôlé, afin d'en trouver l'origine potentielle et de modifier les conditions expérimentales en conséquence. Une veille bibliographique et technique permettra également d'optimiser les conditions expérimentales avec pour objectif final une réduction du stress, de la douleur et de la souffrance potentielle de l'animal.

Enfin, pour l'ensemble des procédures proposées par le plateau, les animaux sont manipulés quotidiennement pour une durée minimale de 3 jours avant toute étude comportementale, et ceci dans la pièce où se déroule le test. Cette démarche permet de réduire le stress lié à la manipulation et d'habituer l'animal à l'expérimentateur et aux pièces d'expérimentation.

**9318** La dépression et le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une résistance de l'organisme à l'insuline, font partie des maladies ayant un fort impact sur la santé publique dans le monde. De nombreuses études épidémiologiques montrent que ces deux pathologies sont étroitement liées. Néanmoins, les mécanismes sous-tendant le développement de ces deux pathologies restent peu connus et nécessitent une attention particulière. Au niveau cérébral, l'inflammation chronique est d'une part, une conséquence associée au DT2 et d'autre part, impliquée dans développement des troubles de l'humeur.

Le milieu marin constitue la plus grande partie de la biosphère et contient les formes les plus anciennes et variées de la vie. Cette diversité de vie et d'environnements atypiques ouvrent des perspectives pour le développement de nouvelles molécules bio-actives. Les organismes marins, et notamment les algues marines possèdent un immense potentiel de molécules originales d'intérêt biologique. Ainsi, les extraits d'algues, qui contiennent des molécules aux potentiels bioactifs métaboliques (insulinosensibilisateur), anti-inflammatoires et anti-oxydants, représentent une stratégie nouvelle pour la prise en charge ou la prévention de ces troubles et une alternative à l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires classiques qui ont des effets secondaires multiples qui limitent leur utilisation. Cependant, aucune approche n'a encore été mise en oeuvre pour étudier le potentiel d'un mélange d'actifs algosourcés consommés par des personnes souffrant de troubles comme la dépression associée au DT2. Dans ce contexte, ce projet propose de tester un actif algosourcé assimilable au niveau intestinal, ciblant l'inflammation et l'insulino-résistance dans le but d'améliorer les troubles de l'humeur liés au diabète.

Pour cela, des animaux nourris avec une diète obésogène et diabétogène enrichie en gras et en sucre recevront dans l'eau de boisson un extrait d'algue verte (*Ulva* sp.) pendant 16 semaines avant de subir des tests comportementaux permettant d'apprécier leur état émotionnel et métabolique. Nous déterminerons ainsi si la supplémentation d'animaux avec un tel extrait d'algue permet de prévenir le développement de troubles métaboliques et émotionnels induit par l'alimentation enrichie en gras et en sucre.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 116 souris mâles adultes sur une durée d'un an. L'étude de comportements anxio-dépressifs ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement). Aucune manipulation d'induire

de la douleur aux animaux. Une expérience pilote s'assurera de la non-toxicité de l'extrait d'algue administré dans l'eau de boisson.

**9319** Chez les Mammifères, comme chez toutes les espèces ayant un déterminisme du sexe génétique, le sexe « chromosomique » se met en place dès la fécondation en fonction du chromosome sexuel apporté par le gamète fécondant du mâle (XY). Ainsi, il est largement admis que le dimorphisme sexuel débute bien avant l'imprégnation hormonale, dès les stades précoces du développement embryonnaire. De nombreuses études scientifiques portent sur la souris, modèle présentant des spécificités (inactivation très précoce du chromosome X, grand nombre de gènes inactivés...) qui ne semblent pas extrapolables à d'autres espèces, dont les bovins, où ces phénomènes sont beaucoup moins documentés. De plus, l'embryon est très sensible aux perturbations de son environnement qui peuvent affecter son développement et avoir des conséquences sur l'individu adulte et ses descendants. Le projet présenté vise, chez le bovin, à étudier l'expression des gènes en lien avec le dimorphisme sexuel selon différentes méthodes analytiques (analyse du génome, méthylome, transcriptome, métabolome...) et à 3 stades clés de développement (6-7, 18 et 40 jours post-fécondation ou jpf pour lesquels on parle respectivement d'embryons, de conceptus et de fœtus). Afin d'évaluer l'impact d'un changement d'environnement sur les voies de signalisation, deux environnements distincts seront utilisés (environnement in vivo ou in vitro pendant les 7 premiers jours du développement). Outre l'acquisition de connaissances nouvelles, ce projet permettra d'optimiser les biotechnologies de l'embryon bovin par la prise en compte des besoins spécifiques liés au sexe. Pour cela, 30 génisses pubères de 14 à 18 mois de race Prim'Holstein seront utilisées dans le cadre de ce projet qui respecte la règle des 3R :

Remplacement : aucun modèle ex vivo ne permet à ce jour d'étudier les réseaux de gènes impliqués dans le dimorphisme sexuel précoce chez les bovins, justifiant ainsi le recours à l'animal.

Réduction : compte-tenu des besoins en matériel biologique pour les analyses de gènes et des exigences de calendrier, le protocole expérimental adopté permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés en répétant, de façon raisonnée, les procédures expérimentales sur les mêmes individus.

Raffinement : les procédures utilisées dans le cadre de ce projet sont semblables aux techniques utilisées en élevage dans le cadre des activités de transfert embryonnaire et ne sont pas susceptibles d'engendrer de stress ou de douleur. De plus, les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (10m<sup>2</sup> par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales.).

**9320** Les virus oncolytiques sont de nouveaux agents thérapeutiques qui présentent trois caractéristiques majeures : 1) La capacité à cibler et détruire spécifiquement les cellules tumorales sans toucher aux cellules saines. 2) Une forte immunogénicité qui permet d'activer très efficacement les cellules de l'immunité anti-tumorale. 3) La possibilité d'exprimer au sein même des tumeurs des molécules thérapeutiques d'intérêt qui seront produites par les cellules tumorales infectées.

Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur l'utilisation de ces virus, ce qui nous a permis de caractériser leurs effets thérapeutiques contre différents types de tumeurs agressives (mésothéliome, mélanome, cancer du poumon...). Notre objectif scientifique principal est de caractériser et d'exploiter les réponses immunitaires induites par ces virus, ce qui nécessite de travailler dans des organismes vivants puisque ces réponses impliquent des mécanismes et des types cellulaires qui fonctionnent de façon systémique. En modifiant les virus pour améliorer ces capacités pro-immunitaires et anti-tumorales, nous souhaitons développer de nouveaux agents thérapeutiques utilisables chez des patients atteints de cancers agressifs résistants aux thérapies actuellement disponibles. En parallèle, nous travaillons aussi à caractériser les mécanismes de résistance à ces virus, qui impliquent notamment la réponse antivirale interféron (IFN) de type I, et à identifier des agents pouvant être utilisés en combinaison avec ces virus.

Les deux virus que nous avons utilisés jusqu'à présent, deux souches atténuées des virus de la rougeole et de la vaccine, sont difficilement utilisables dans ce type d'expériences puisqu'ils ne sont

pas capables d'infecter les cellules tumorales non issues de primates. Nous développons donc à présent des travaux sur un troisième virus oncolytique, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), qui peut infecter les cellules tumorales dérivées de quasiment toutes les espèces de mammifères.

Le projet se décompose en deux parties principales :

1) Déterminer l'impact de la réponse IFN de type I suite au traitement de tumeurs par un VSV oncolytique, puis étudier l'intérêt d'un inhibiteur spécifique de cette réponse pour améliorer l'efficacité de la virothérapie.

2) Tester différents VSV modifiés pour exprimer des molécules immunothérapeutiques au sein des tumeurs et caractériser leur impact sur l'immunosuppression du microenvironnement tumoral.

Une attention toute particulière sera donnée à la réduction du nombre de souris utilisées par des études statistiques a priori.

Les méthodologies utilisées prendront en compte le suivi des points limites pour interrompre l'expérimentation le plus tôt possible et minimiser douleur et détresse des animaux. Des technologies alternatives seront utilisées à chaque fois que la question scientifique posée sera compatible avec l'utilisation de modèles in vitro. A titre d'exemple, quand un nouveau virus VSV sera construit, son efficacité d'action sur les cellules exprimant la cible sera d'abord évaluée dans des modèles de sphéroïdes (tumeurs in vitro en 3D) récemment développés dans notre laboratoire. Le milieu d'hébergement des souris sera par ailleurs enrichi (lambeaux de papier, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 452 souris sur 5 ans.

**9321** Le mode de vie actuel (sédentarité, alimentation...) accompagné de facteurs de risques tels que l'hypertension artérielle, la surcharge pondérale... sont à l'origine de pathologies chroniques (maladies cardiovasculaires, diabète...) qui représentent les premières causes de mortalité dans les pays développés. L'activité physique peut être bénéfique sur ces facteurs de risque et prévient et/ou réduit les symptômes de ces pathologies. L'Organisation Mondiale de la Santé préconise la pratique régulière d'un exercice physique (au minimum 150min d'activité physique modérée ou 75min de forte intensité par semaine). Actuellement les types d'entraînement physique reconnus comme étant les plus bénéfiques sur la santé sont le continu et l'intermittent. Le continu est pratiqué à intensité modérée pendant une durée relativement longue ( $\geq 1$ h). L'intermittent est caractérisé par de courtes fractions de haute intensité avec des intervalles de temps de récupération réguliers. Chez l'Homme, il est démontré que l'intermittent par rapport au continu augmenterait et stimulerait davantage la production d'énergie par les mitochondries. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la production d'énergie et de radicaux libres (stress oxydant) participera à la mise en place de programmes d'entraînement physique bénéfiques pour la santé. La voie de signalisation cellulaire AMPK-PGC-1 $\alpha$  est conservée chez tous les eucaryotes et c'est la voie principale qui stimule la production de mitochondries et les capacités oxydatives au cours d'une activité physique. Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent ces réponses métaboliques ainsi que leur cinétique de mise en place ne sont pas encore totalement élucidés. L'objectif premier est d'étudier les adaptations musculaires à l'entraînement de manière intégrée de l'organisme entier jusqu'aux gènes en lien avec la performance à différents niveaux biologiques (physique, fonction mitochondriale, antioxydant, production mitochondriale...). Le second objectif est de déterminer le décours temporel d'adaptations transcriptionnelles et biochimiques de la fonction mitochondriale, de la biogénèse mitochondriale ainsi que de l'état antioxydant musculaire et cardiaque lors de d'entraînement continu et intermittent. Le modèle choisi est la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* pour sa capacité d'adaptation rapide à un entraînement physique de quelques jours ainsi que pour la facilité de mise en place d'un protocole de nage. Chez le poisson la voie de signalisation AMPK-PGC-1 $\alpha$  est active, tout comme chez le mammifère. L'objectif sera aussi de mettre en avant l'intérêt du modèle poisson dans l'étude des effets bénéfiques d'un entraînement physique. Ainsi 170 truites suivront un protocole d'entraînement à la nage continue ou intermittente de 10 ou 20 jours. Ce projet est construit en respectant la règle des 3R. Réduction : le nombre de poissons comprend 10 animaux par lot (1 lot = 1 intensité d'entraînement, 1 durée). Ce nombre de 10 animaux par lot pour un total de 17 lots constitue un minimum pour effectuer l'étude statistique des résultats obtenus suite à la réalisation des procédures expérimentales contenues dans ce projet. Remplacement : ce projet ne pourrait se faire sans utiliser

d'animaux étant donné le caractère intégré de cette étude. Le raffinement est respecté dans le cadre des conditions d'hébergement des animaux et par la surveillance de ceux-ci lors de nos différentes procédures. Trois procédures sont envisagées dont l'une d'elle est sévère. Les animaux réalisent une épreuve d'effort à l'issue de laquelle ils sont mis au repos dès l'objectif atteint.

**9322** L'objectif de cette formation est de fournir une formation pratique aux chirurgiens de la rétine sur la technique d'administration d'un produit indiqué pour le traitement des patients souffrant d'une perte de vision due à une pathologie héréditaire rétinienne. Le produit ne sera administré chez les patients que par un nombre limité de chirurgiens rétiens expérimentés dans les chirurgies vitéo-rétiennes. Ces chirurgiens devront suivre une formation obligatoire sur les procédures d'injection sous-rétinienne. Cette démarche a été approuvée par les autorités européennes de santé.

Cette formation est un élément clef afin que les chirurgiens de la rétine puissent pratiquer la technique standardisée avant d'effectuer une intervention chirurgicale chez l'homme. Cette formation permettra d'obtenir de meilleurs résultats en termes d'efficacité et sécurité dans cette population de patients. Les expérimentations pratiques sont des éléments importants de l'enseignement des principes et techniques chirurgicaux en pratique médicale.

Le modèle de l'œil de lapin a été choisi parce que c'est le seul modèle dans la catégorie des petits animaux avec des caractéristiques anatomiques comparables à l'œil humain pour simuler de manière appropriée les procédures chirurgicales. L'utilisation de rongeurs de plus petite taille (rat ou souris) n'est pas considérée appropriée pour la formation à cette technique. Afin de comprendre la complexité des systèmes biologiques, les animaux vivants sont ici une nécessité. Par conséquent, d'autres types de scénarios de simulation (en particulier expériences in vitro) ne sont pas suffisants en raison de l'incapacité à fournir un environnement réel qui aide à comprendre et envisager les complications éventuelles lors de l'apprentissage de la technique par le personnel formé.

Historiquement, le lapin a également été utilisé dans des études d'évaluation de la sécurité des médicaments et est une espèce appropriée pour l'examen par les agences réglementaires.

Avant la procédure de formation, les animaux seront hébergés de manière individuelle avec un enrichissement du milieu approprié, dans des cages conformes à la directive 2010/63 et sa transposition française. Le comportement des lapins mâles et femelles d'un âge de 3-4 mois ne permet pas de les héberger en groupes (risque de disputes et blessures graves). Les animaux devront être en bonne condition physique/clinique, et des soins adéquats leur seront prodigués tout au cours de leur hébergement dans l'entreprise. Les animaux identifiés pour les formations sont observés tous les jours afin de s'assurer de leur bien-être et de leur bonne condition. Les paramètres suivants sont contrôlés régulièrement afin d'évaluer l'état de santé des animaux : poids corporel, consommation de nourriture et d'eau, température corporelle, signes cliniques, (liste non exhaustive). Toute anomalie est signalée au vétérinaire. Il lui incombe la décision de donner les traitements nécessaires ou d'euthanasier les animaux au vu des signes observés.

L'expérimentation en elle-même sera effectuée sur animaux anesthésiés ayant reçu au préalable un protocole analgésique. Les animaux seront euthanasiés sans réveil à la fin de la procédure chirurgicale. En cas d'anomalie lors de la procédure chirurgicale (erreur technique, saignement imprévu, ou tout autre point limite observé), les animaux seront euthanasiés par une overdose de pentobarbital sodique.

De manière à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, les 2 yeux de chaque animal seront utilisés pour la formation. Un maximum de 3 animaux sera utilisé par binôme de chirurgien à chaque session de formation, avant d'être considéré apte à pratiquer cette intervention chez l'homme. Le nombre total d'animaux pourra atteindre 400. Au préalable, une formation théorique et scientifique sera dispensée au personnel à former. La technique chirurgicale sera effectuée sous microscope opératoire et des vidéos pourront être enregistrées. Ces vidéos pourront servir pour compléter la formation en fin de pratique et comme support pour les formations ultérieures. Un formateur sera toujours présent lors des sessions de formation. Ces sessions de formation seront toujours réalisées dans un environnement contrôlé, dans une salle de chirurgie, sous la supervision d'un vétérinaire et en collaboration avec les techniciens formés à l'expérimentation animale.

9323

L'ostéosarcome est un cancer rare, très agressif qui se développe dans l'os et métastase au niveau des poumons. La prise en charge des patients associe de la chimiothérapie à la résection totale de la tumeur et n'empêche pas les rechutes. C'est pour cela qu'il est nécessaire de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques afin d'aider les médecins à soigner au mieux leurs patients.

Le système immunitaire reconnaît normalement le cancer comme étant étranger, et détruit les cellules tumorales. Cependant les cellules tumorales mettent en place des mécanismes pour contourner la surveillance exercée par le système immunitaire et progresser.

De nouvelles immunothérapies ont été développées afin de réactiver le système immunitaire pour lui permettre d'induire à nouveau la mort des cellules tumorales.

Au vu de l'implication du système immunitaire dans la progression de l'ostéosarcome, ce projet permettra l'analyse de l'effet de thérapies modulant le système immunitaire sur l'évolution de l'ostéosarcome. Le but de ce projet est d'identifier une approche d'immunothérapie la plus efficace qui permette de stimuler le système immunitaire afin de ralentir la progression tumorale.

Des analyses d'échantillons de patients ainsi que des expériences sur des cellules tumorales in vitro ont montré la validité d'une approche d'immunothérapie ciblant soit les macrophages (une sous-population du système immunitaire), soit les points de contrôle immunitaires (qui permettent au cancer de devenir invisible du système immunitaire).

Ce projet doit être poursuivi sur un modèle animal pourvu d'un système immunitaire. Le modèle d'ostéosarcome est établi chez des rats immunocompétents et mime la pathologie humaine. Le fait que ce modèle soit établi chez des animaux ayant un système immunitaire en fait un outil de choix pour l'évaluation d'immunothérapies et fournit également des données essentielles pour l'application de ces thérapies chez l'homme.

Ce modèle est obtenu par greffe d'un fragment tumoral au niveau du tibia de l'animal, pour reproduire au mieux la pathologie humaine. Afin de réduire au maximum la douleur induite à l'animal au cours de cette opération, un antidouleur sera administré à l'animal avant la chirurgie réalisée sous anesthésie générale.

Ce projet s'articulera en différentes étapes, nous permettant donc de réduire au maximum le nombre d'animaux à inclure dans nos études.

-Une première étape de « réactivation du modèle » à l'aide d'une tumeur congelée. Ceci nous permettra à partir de rats donneurs d'implanter des greffons tumoraux sur les animaux utilisés dans les procédures suivantes.

-Les doses optimales des traitements testés ne sont pas connues chez le rat, avant de tester l'efficacité antitumorale de ce composé nous réaliserons une étude d'efficacité de dose (3 doses testées par traitement) sur un faible nombre d'animaux.

-Puis, l'activité antitumorale de trois agents sera testée : un agent ré-induisant l'immunité anti-tumorale, un ayant pour but de réduire la proportion de macrophages, et un levant le frein immunitaire. L'évaluation de chaque traitement sera réalisée sur le nombre de rats minimum afin d'obtenir des résultats statistiques qui nous permettront de prouver avec certitude l'effet anti-tumoral des thérapies.

-Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces traitements modifiant l'environnement immunitaire des tumeurs, dans une étape supplémentaire nous étudierons la cinétique de modification de l'environnement immunitaire en réponse à chacun de ces traitements.

-Finalement, les deux traitements immunomodulateurs les plus efficaces seront associées et leur action anti-tumorale testée

Après chaque étape du projet, des analyses de la tumeur et du sang permettront de vérifier que le traitement cause un ralentissement de la progression tumorale et permet de réactiver le système immunitaire.

Ces analyses nous permettront d'adapter la suite de notre projet. En effet, nous ne garderons que les approches thérapeutiques qui permettent de ralentir la croissance de la tumeur pour les étapes suivantes du projet.

Tout au cours de ce projet, les précautions seront prises pour stresser au minimum l'animal.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés par cage de 3 individus, leur milieu sera enrichi d'objets à grignoter, de cachettes afin de les distraire.

Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées sous anesthésie générale et après administration d'un analgésique.

Après chaque injection le rat recevra une « friandise ».

L'état général et le comportement des animaux seront suivis deux fois par semaine et la taille des tumeurs sera mesurée. Nous observerons tout signe de douleur relatif à la progression tumorale ou à un possible effet secondaire du traitement. En cas de signes de douleurs chez l'animal, une injection d'antidouleur sera effectuée.

Durant ce projet d'une durée de 5 ans, nous utiliserons un maximum de 678 rats.

Ce projet peut aboutir à de nouveaux traitements pour l'ostéosarcome, et peut permettre de proposer une alternative thérapeutique autre que la chimiothérapie aux patients atteints de cette maladie. Notre projet est donc véritablement dédié au transfert rapide de données vers le lit du patient, et le passage par une phase d'expérimentation animale est nécessaire.

**9324** Les ruptures du ligament croisé antérieur (LCA) du genou surviennent notamment dans la pratique des sports de pivot (ski, tennis, football). En l'absence de traitement, l'instabilité du genou qui en résulte génère à court terme des lésions des ménisques et du cartilage, et à long-terme de l'arthrose souvent invalidante. La reconstruction chirurgicale du LCA est ainsi souvent nécessaire, particulièrement chez les sujets jeunes et/ou sportifs, et constitue l'une des interventions chirurgicales les plus pratiquées dans le monde.

Les techniques chirurgicales actuelles reposent sur le remplacement du LCA par une autogreffe (tendon prélevé chez le patient, technique de référence en France), ou par un ligament synthétique, non dégradable (comme le LARSTM, en Polyéthylène téréphtalate-PET). Cependant, ces techniques comportent des inconvénients majeurs : morbidité du prélèvement tendineux, taux de rupture élevé et persistance dans l'articulation des ligaments synthétiques.

De manière à réduire les complications associées au prélèvement de la greffe tendineuse et les risques liés à l'utilisation d'un ligament artificiel, des publications récentes proposent une alternative qui consiste en l'ajout d'un tuteur pour aider la cicatrisation du ligament rompu. Ainsi, l'utilisation de ligaments synthétiques résorbables comme renfort temporaire du LCA pendant sa cicatrisation permettrait de s'affranchir du prélèvement tendineux et d'offrir un soutien mécanique immédiat. Le caractère résorbable pallierait aux inquiétudes liées à la persistance du matériel synthétique dans l'articulation; son greffage (modification de sa surface par ajout de polymère bioactif, mimant une biomolécule) permettrait de diminuer la réponse inflammatoire générée, comme cela a déjà été démontré pour le ligament LARSTM dans un modèle ovin.

Ce projet propose d'évaluer dans un modèle de section du LCA chez le rat, un ligament constitué de polymères commercialisés en chirurgie et utilisés dans d'autres indications que la rupture du LCA chez l'homme, avec deux objectifs :

(1) Montrer que ce nouveau ligament, utilisé comme renfort ligamentaire, est au moins aussi performant que les techniques de remplacement usuelles. Nous comparerons 4 groupes de 7 animaux : un groupe avec section ligamentaire simple sans renfort, deux groupes ayant été traités, le premier par la mise en place d'une autogreffe, le second par celle du ligament synthétique en PET, et un groupe traité avec le nouveau ligament non greffé.

(2) Evaluer l'effet du greffage sur la réponse biologique. Nous évaluerons le ligament en PET (non évalué chez le rat) et le nouveau ligament (évalué seulement in vitro) en implantant ces ligaments greffés chez deux groupes de 7 rats, que nous comparerons aux groupes ayant reçu leurs homologues non greffés.

Quarante-deux animaux seront utilisés, ce qui est le minimum indispensable pour une interprétation statistique des données tenant compte de la faible probabilité de perte d'un animal (morbidité et mortalité associées au modèle faibles) et de la variabilité limitée des réponses.

Il n'existe pas de modèles in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité des mécanismes biologiques et biomécaniques impliqués dans la cicatrisation du LCA. Le niveau de souffrance sera évalué par une observation régulière de l'animal et l'analgésie adaptée consécutivement à ces observations. Les animaux sont euthanasiés au terme des 3 mois de suivi.

**9325** Des travaux épidémiologiques chez l'adulte ont démontré que la consommation de viande rouge et de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon et de diabète de type 2. Cette association a été également observée expérimentalement chez le rongeur et les mécanismes

mis en évidence à l'heure actuelle sont les suivants : après digestion, le fer de l'hémoglobine contenu dans la viande et les charcuteries induit l'oxydation de lipides au niveau du côlon. Ces lipides oxydés, les alcenals, entraînent localement des modifications caractérisées par une inflammation de la muqueuse colique, et une altération à la fois de la fonction barrière de l'intestin, de la composition du microbiote (flore microbienne) et des métabolites. Dans le cas d'une consommation régulière et importante de viandes rouges/charcuteries, il est donc probable que ces altérations deviennent chroniques et engendrent à long terme la formation d'adénocarcinomes coliques et des troubles du métabolisme.

En revanche, les conséquences d'une exposition d'origine maternelle à ce stress nutritionnel sur la descendance sont totalement méconnues à ce jour.

Il s'agit maintenant d'évaluer l'impact de la consommation d'un régime enrichi en fer héminique par la souris femelle en période périnatale sur l'écosystème colique de sa descendance au cours du développement et la survenue de maladies chroniques à long terme en suivant des marqueurs précoces de cancérisation au niveau du côlon et de troubles du métabolisme. Une comparaison avec une exposition directe chez l'adulte sera réalisée.

Ce projet sur 5 ans, non modélisable par une approche cellulaire, nécessitera l'utilisation de 846 souris pour lesquelles les altérations de l'écosystème intestinal potentiellement induites chez la descendance ne sont pas censées conduire à un phénomène douloureux. L'ensemble de l'expérimentation a été construit dans le respect de la règle des 3R.

Le nombre d'animaux prévu a été calculé au plus juste selon la convention établie pour les études développementales afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables et exploitables avec le moins de portées possibles. Les souris seront logées dans des locaux d'animalerie conventionnelle, dans un environnement contrôlé et enrichi, et avec un personnel compétent, leur assurant les meilleures conditions de bien-être et de bonne santé. Aucune douleur n'est attendue en réponse à ce régime alimentaire, la formation des lésions prénéoplasiques étant indolore à ce stade. Néanmoins, nous resterons attentifs à l'état général des animaux (poils hérissés, animal prostré, comportement agressif ou léthargique), leur prise alimentaire et prises de poids.

**9326** Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, les tumeurs cérébrales les plus agressives (glioblastome) sont la 3ème cause de décès par cancer chez l'adulte. Le traitement de référence consiste, lorsque cela est possible, à retirer chirurgicalement la tumeur, puis à traiter par radiothérapie et chimiothérapie. Cependant dans certains cas, ces tumeurs ne sont ni opérables, ni contrôlables par les thérapies classiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, la thérapie photodynamique (PDT) s'inscrit comme une stratégie complémentaire prometteuse pour améliorer l'éradication tumorale. La PDT est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière (apportée par une fibre optique) et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses.

La finalité clinique de notre recherche est de proposer une nouvelle thérapie non invasive pour le traitement des glioblastomes : la thérapie photodynamique interstitielle (fibre optique insérée au sein de la zone tumorale) anti-vasculaire (ciblage et destruction des vaisseaux sanguins de la tumeur).

Des nanoparticules utilisées en clinique (Phase I) pour l'imagerie (agent de contraste pour l'IRM) et le traitement des tumeurs cérébrales ont été fonctionnalisées avec un photosensibilisateur (pour réaliser le traitement PDT) et une molécule ciblant les vaisseaux sanguins de la tumeur afin de favoriser l'effet anti-vasculaire du traitement par thérapie photodynamique.

Une précédente étude nous a permis de valider chez l'animal la faisabilité du concept de la thérapie photodynamique interstitielle et d'optimiser les conditions de traitement. Des études *in vitro* (REPLACEMENT) ont permis de valider la stratégie de ciblage du réseau vasculaire de la tumeur ainsi que la potentialisation de l'effet vasculaire de la thérapie photodynamique.

Nous devons maintenant confirmer ces résultats *in vivo*. Le REPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'efficacité des thérapies anticancéreuses dépend, chez l'animal comme chez l'Homme, de phénomènes complexes (inhérents à la physiopathologie cancéreuse d'une part, et, au comportement des nanoparticules en

milieu biologique d'autre part) qui ne peuvent pas être appréhendés dans leur globalité sur des modèles cellulaires in vitro.

Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur 180 rats et 54 souris porteurs d'une tumeur intracérébrale.

Des méthodes non-invasives d'imagerie par IRM et microscopie intravitale seront utilisées permettant de réaliser différents types d'examens, et de les réitérer dans le temps sur un même animal (REDUCTION). Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats et les souris seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie, traitement), et euthanasiés dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) : apparition d'altérations fonctionnelles, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffes s'étalant sur plus de trois jours consécutifs, altération de l'aspect général de l'animal ou de son comportement, tumeur supérieur à 5 mm de diamètre chez le rat et 2 mm chez la souris.

**9327** Le cerveau est un organe particulièrement radiosensible pendant son développement foetal. En effet, de nombreuses études suggèrent qu'une irradiation durant le développement embryonnaire provoquerait des anomalies du cerveau décelables à l'âge adulte.

Notre laboratoire s'intéresse aux effets de l'irradiation et les conséquences sur la production des neurones qui sont générés au cours du développement du cerveau à partir de différents types de cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN). Nos études se concentrent plus particulièrement sur les réponses de l'organisme aux dommages de l'ADN créés par les irradiations dans ces cellules. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour concevoir des traitements efficaces contre des irradiations pouvant avoir lieu lors d'examen radiologique chez la femme enceinte au cours de 3 premiers mois de grossesse (période où elle ne sait pas forcément qu'elle est enceinte) ou lors d'irradiations accidentelles.

Le but de ce projet est d'analyser le rôle de sept protéines impliquées dans ces mécanismes dans les CSPN après irradiation. Aucune méthode in vitro ou in silico n'existe à ce jour qui pourrait modéliser la complexité du cerveau et l'ensemble des processus physiologiques ayant lieu au cours du développement embryonnaire du cerveau.

Le modèle rongeur a été retenu car sa neurogenèse présente de nombreuses caractéristiques communes à l'ensemble des mammifères. De plus, ce modèle nous permet d'utiliser des lignées de génotypes différents (par exemple, avec inactivation d'un gène codant l'une des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN) nécessaires afin d'étudier le rôle spécifique de différentes protéines d'intérêt.

Dans ce modèle il est possible de suivre la progression du cycle cellulaire de chaque cellule du néocortex et ainsi de mieux comprendre le rôle des différentes protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN dans les CSPN du cerveau en développement en condition normale et après une exposition aux radiations ionisantes.

Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude qui durera cinq ans est de 168 souris gestante et de 672 embryons par an soit un total sur 5 ans de 840 femelles gestantes et 3360 embryons. Ce nombre a été déterminé comme étant le nombre d'animaux suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables ne compromettant pas la validité des expériences. Ce protocole regroupe pour chacune des sept lignées de souris déficientes pour un gène donné, une possibilité de tester 8 conditions par lignée (variations dans les délais d'injection Edu/BrdU, ou dans la dose irradiation reçue). A partir de ces échantillons, le cycle cellulaire des cellules sera étudié in situ par immunohistologie.

L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences et évalué cliniquement afin de limiter leurs contraintes. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation. Afin de garantir au mieux leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupe et disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu des souris est également enrichi à l'aide de coton de nidification et de tube en carton. L'application de critères d'arrêts aux expériences nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.



- 9328** Les infections relatives à la pose d'implant en chirurgie sont des problèmes cliniques sérieux induisant un taux de mortalité élevé. Les thérapeutiques actuelles (antibiotiques ou molécules naturelles) ne sont plus efficaces et favorisent l'émergence de nombreuses résistances. Ce projet permettra de faire la preuve de concept d'une thérapie prophylactique antimicrobienne innovatrice avec un nouveau système d'implants recouverts d'antibiotiques ou autres substances alternatives aux antibiotiques. Deux études préliminaires ont permis de valider la chirurgie expérimentale de l'ostéotomie partielle du tibia du porc et la pose d'implants cylindriques biomédicaux. Ces études préliminaires ont permis aussi de choisir la souche bactérienne infectieuse et le choix des doses de bactéries pour infectés. Cette expérimentation permettra de mesurer l'efficacité antimicrobienne de ces implants biomédicaux contre l'infection intra-osseuse du tibia chez le porc. L'infection se fera avec une souche *Staphylococcus aureus* (souche sensible aux antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine) spécifique de l'os. Des ostéotomies partielles (réalisation chirurgicale d'un trou cylindrique au niveau du tibia permettant la pénétration des bactéries) seront réalisées sur 34 porcs de 3 mois, dont 17 porcs pour une première expérimentation pour tester un antibiotique et une seconde de 17 porcs pour tester une molécule naturelle. Les porcs sont répartis en lots : (i) un lot de porcs ostéomisés, non infectés avec implants traités, (ii) un lot de porcs ostéomisés infectés avec des implants non traités et (iii) un lot de porcs témoins ostéomisés infectés et avec des implants traités.
- Remplacement : L'infection osseuse à *S. aureus* et la pose d'implants, étant difficiles à modéliser in vitro, le modèle animal est indispensable en vue d'une transposition chez l'Homme.
- Réduction : Ce projet permettra de déterminer la tolérance de l'os à l'implant traité et de mesurer de son efficacité antimicrobienne. La pose d'implants sera faite au hasard afin de limiter le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en répondant aux questions scientifiques. Le nombre d'animaux par lot se base aussi sur les résultats des expérimentations préliminaires réalisées.
- Raffinement : les porcs seront sous anesthésie générale durant l'intervention chirurgicale et recevront un traitement permettant de contrôler la douleur; sous supervision vétérinaire et zootechnique pendant 14 jours post-opératoire. Il y aura un enrichissement social (hébergement, groupe/visites animalières) et environnemental (ballon, chaînes). L'utilisation de l'imagerie (CTscan et IRM) permettra de faire le suivi postopératoire de manière non invasive et sans douleur pour l'animal.
- 9329** Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Ainsi les états de vigilances sont dus aux changements de l'activité neuronale. Bien que de nombreuses avancées dans le domaine aient été réalisées, la nécessité des changements d'activité neuronale qui se produisent lors des différentes phases du sommeil reste peu comprise. Il ressort pourtant que le besoin vital de dormir met en jeu des mécanismes permettant au système de se « réinitialiser ». Il est probable qu'outre les neurones, les cellules de soutien des neurones, les cellules gliales, participent à la remise à zéro du système. La contribution des cellules gliales est pourtant peu étudiée. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules gliales dans les différents états de vigilance. Nous étudierons ces cellules sur un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements de certaines cellules gliales seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent durant les phases de sommeil et ainsi de mieux comprendre la nécessité du sommeil dans les mécanismes de mémorisation.
- Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. Le nombre d'animaux utilisés sera restreint au maximum (85 souris).
- Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes de mémorisations mis en jeu durant les cycles veille/sommeil et des interactions cellulaires qui les sous-tendent. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'identifier de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires impliquées dans les pathologies du sommeil et de la mémoire.

**9330** Ces travaux pratiques (TP) concernent des étudiants en licence professionnelle, destinés à la profession d'assistant-ingénieur. Ils doivent être à même de trouver des emplois dans les secteurs privés ou publics et dans des domaines variés comme le diagnostic, l'analyse mais aussi la recherche et le développement. Ils peuvent donc être amenés, au cours de leur carrière, à travailler sur des animaux vivants. Les professionnels susceptibles de les recruter souhaitent que ces étudiants soient bien formés aux techniques utilisées en expérimentation animale et soient bien sensibilisés à la notion d'éthique.

Dans ce cadre, ces TP ont plusieurs objectifs, qui s'intègrent dans le programme pédagogique de licence et de formation relatifs à la pharmacologie, la physiologie cardio-vasculaire et l'expérimentation animale :

1. Mettre en pratique l'enseignement théorique en pharmacologie cardiovasculaire.
2. Former les étudiants à la mise en application d'un protocole expérimental visant à évaluer l'effet d'un médicament (à visée humaine) en pharmacologie cardiovasculaire in vivo.
3. Former et responsabiliser les étudiants à la mise en œuvre d'une expérimentation animale chez le rat et à l'éthique (manipulation et surveillance des animaux vigiles et anesthésiés, réalisation de procédures non-invasives.).

Ces TP seront réalisés sur des rats qui présentent spontanément une hypertension artérielle (rats SHR), se développant avec l'âge et significative à partir de 8 semaines d'âge. Le rat SHR est décrit comme un très bon modèle de l'hypertension artérielle primaire humaine et est de ce fait très largement utilisé pour étudier les pathologies cardio-vasculaires et les médicaments anti-hypertenseurs. Cette souche a été obtenue à partir de rats Wistar-Kyoto présentant une pression sanguine élevée, ainsi les rats Kyoto normo-tendus (WKY) constituent les rats contrôles de ce modèle et seront utilisés comme référence dans ces TP.

Au cours de ces TP concernant l'étude d'un anti-hypertenseur, l'Enalapril, sur la pression artérielle chez le rat hypertendu SHR, les étudiants réaliseront : i) la mesure non invasive de la pression artérielle (systolique et diastolique) et la fréquence cardiaque sur des animaux vigiles avant, pendant et après le traitement ; ii) un prélèvement sanguin sur animal anesthésié pour analyser les paramètres hématologiques avant et à la fin du traitement et iii) l'administration par voie orale de l'Enalapril ou du véhicule. Trois lots de rats seront constitués, le lot SHR-E (rats SHR recevant l'Enalapril), le lot SHR (rats SHR contrôles recevant le véhicule) et le lot WKY (rats WKY recevant le véhicule).

Réduction : Chaque promotion de 32 étudiants au maximum est divisée en 2 groupes 16 étudiants. Dans chaque groupe, les étudiants travailleront en binôme et auront 2 rats SHR (1 de chaque lot). Chaque étudiant prendra en charge le traitement et le suivi de son animal, aidé par son binôme. Afin de réduire le nombre d'animaux, seuls 2 rats WKY par groupe de 16 étudiants seront utilisés comme références de pression artérielle normale et serviront également de démonstration par les enseignants des différentes procédures à réaliser. De plus, seuls 3 animaux surnuméraires seront prévus par groupe de 16 étudiants. Ainsi au total 210 animaux seront nécessaires pour 5 ans.

Afin de comparer les résultats obtenus entre les lots expérimentaux, les étudiants travailleront sur les résultats obtenus pour l'ensemble des rats dans leur groupe de 16 étudiants, auxquels nous ajouterons les données des années antérieures au cours de ces 5 ans, permettant encore de limiter le nombre d'animaux par lot et par binôme, mais tout en garantissant l'apprentissage des étudiants.

Raffinement : les animaux seront hébergés en groupe socialement harmonieux dans des cages appropriées à leur espèce et à leur poids et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix). Préalablement aux séances de TP, les animaux seront habitués à la préhension, à la contention et à la mesure de pression artérielle / fréquence cardiaque (grâce à un système d'apprentissage/récompense), afin de limiter leur stress lors du protocole et de leur utilisation par les étudiants. De plus avant les TP, les étudiants seront sensibilisés à la préhension/contention des rats, aux procédures à réaliser (TD, vidéo) et au comportement à avoir (être calme, éviter les gestes brusques...). Tout animal stressé ou malade sera exclu et remplacé par un animal surnuméraire (3 animaux maximum prévus en plus / groupe de 16 étudiants). Le prélèvement sanguin sera réalisé chez les rats anesthésiés, qui seront suivis par les étudiants avec l'équipe pédagogique tout au long de l'expérimentation.

Remplacement : A la sortie de la licence, les étudiants doivent être sensibilisés à la manipulation sur animaux vivants et savoir comment réaliser une expérimentation animale dans sa globalité. Il est

donc nécessaire qu'ils pratiquent eux-mêmes ces manipulations. Le programme pédagogique de la licence que nous devons respecter inclut un module intitulé « Expérimentation animale ». Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan pharmacologique au niveau cardio-vasculaire que sur le plan technique (administration de substances sur le rat vigile, prélèvement de sang sur animal anesthésié.).

**9331** Le vieillissement de la population engendre une constante augmentation du nombre de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques, telle que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Ce domaine médical souffre actuellement d'un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Ce projet est destiné à mettre en œuvre des modèles animaux mimant les phénomènes mis en jeu dans ces pathologies, afin d'évaluer les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques. Ces modèles sont développés chez les rongeurs (rat et souris). Les rats et les souris sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives. Ces espèces présentent l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité des modèles et donc une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. La nécessité d'utiliser ces 2 espèces est liée d'une part à des sensibilités différentes d'espèces aux différents modèles et tests comportementaux, et d'autre part au fait que la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour le développement d'animaux transgéniques.

Ces modèles concernent des études soit de courte ou moyenne durée, soit de longue durée (plusieurs mois). Dans le premier cas il s'agira de modéliser des mécanismes physiopathologiques précis impliqués dans ces maladies afin de valider les cibles biologiques travaillées. Dans le second cas, il s'agira d'induire un développement progressif des phénomènes de neurodégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de ces pathologies. Ces différents modèles font appel soit à des techniques d'administration de neurotoxines, ou de protéines pathologiques par voie générale ou centrale (par neurochirurgie), soit à des techniques de surexpression ou suppression d'expression génétique (via les différentes méthodes de modification génétique). Pour préciser le profil des produits étudiés ce projet inclut aussi la possibilité de conduire des études de pharmacocinétique couplées à des évaluations d'activité sur les cibles biologiques et les différents biomarqueurs d'intérêt.

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi les candidats-médicaments ne sont évalués dans ce type de modèles qu'après un tri important via des méthodes de biochimie et biologie cellulaire *in vitro*, permettant de retenir les quelques candidats les plus prometteurs, qui présentent le meilleur index thérapeutique *in vitro* (rapport/activité/profil précoce ADME/toxicité potentielle). De plus ces modèles incluent à la fois des tests comportementaux et des mesures de paramètres biochimiques. Cela permet d'évaluer différents paramètres en parallèle réduisant ainsi le nombre d'études et permettant de corrélérer ces différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces informations sont nécessaires et indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et sûre. Le cerveau est constitué de plusieurs types cellulaires différents qui interagissent pour la mise en œuvre des processus physiologiques mais aussi neurodégénératifs. Il présente de plus la particularité d'avoir une grande capacité de plasticité et d'être très dépendant de sa vascularisation. Cette dynamique du fonctionnement physiopathologique du cerveau et sa traduction en capacités mnésiques, associatives et motrices ainsi que le lien avec des biomarqueurs centraux et périphériques ne peuvent être évalués que par les études chez l'animal. Un support du service biostatistiques est apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études (en fonction de l'objectif de l'étude, de son design, de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données) et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des rongeurs), en réduisant les contraintes de traitement par incorporation des produits dans la nourriture ou l'eau de boisson pour les études chroniques, en privilégiant les modèles transgéniques à phénotype non-

dommageable, en utilisant les anesthésiques et analgésiques les mieux appropriés en cas de chirurgie (pour les administrations centrales) pour préserver la validité du modèle tout en réduisant les douleurs liées aux incisions de la peau. Les phénomènes de neurodégénérescence centrale ne produisent pas par eux-mêmes de phénomènes douloureux. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal.

Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Ces procédures sont discutées et approuvées par le comité d'éthique avant leur mise en œuvre, et celle-ci se fait en lien avec la structure chargée du bien-être de l'animal, afin de permettre une amélioration constante des conditions de recours à l'animal.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans le cadre de ces modèles est estimé à 50000 souris et 5000 rats.

**9332** Le diabète correspond à une élévation prolongée de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Dans le cas du diabète de type 2 (90% des cas de diabète), ce phénomène provoqué par une perturbation du métabolisme glucidique apparaît progressivement et insidieusement.

En France, en 2015, 3,7 millions de personnes prenaient un traitement médicamenteux pour leur diabète (soit 5,4% de la population). A cela, s'ajoutent les personnes diabétiques qui s'ignorent. Cette prévalence ne cesse d'augmenter en France, particulièrement chez les hommes, les jeunes (<20 ans) et les plus âgés (>80 ans). Les industriels des secteurs pharmaceutiques et agroalimentaires cherchent donc des molécules et ingrédients pouvant agir sur la limitation du passage dans le sang des sucres ingérés lors des repas.

Le but de ce projet d'une durée de 5 ans est d'étudier les effets de 30 composés administrés par voie orale à 2 doses en comparaison avec un antidiabétique oral de référence (Acarbose) sur la glycémie postprandiale de souris diabétiques afin de développer des produits pharmaceutiques et/ou alimentaires destinés aux diabétiques de type 2. Ces composés, sélectionnés sur la base d'études réalisées *in vitro*, et dont les études de toxicité auront démontré leur innocuité, seront retenus pour être testés chez l'animal.

Pour réaliser ce projet, un maximum de 1080 souris mâles diabétiques (db/db) de 6 à 8 semaines sera nécessaire sur 5 ans, en 15 études séparées avec 72 souris par étude et selon le design suivant : répartition en 6 groupes de 12 souris chacun, traitées par gavage avec le véhicule de mise en solution des composés testés (groupe 1), les 2 composés testés à 2 doses différentes (groupes 2 à 5) ou l'Acarbose (groupe 6), antidiabétique oral de référence qui sera utilisé à une dose équivalente à l'une des 2 doses des composés à tester.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) dans une animalerie climatisée, à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $50 \pm 20\%$ , et ils seront soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00) afin d'observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des feuilles de papier type sopalin seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement). Ils auront accès à un régime spécial pour entretenir leur pathologie et de l'eau fournis *ad libitum*. Les expérimentations débiteront après une période d'acclimatation de 7 jours.

Afin de répartir de façon homogène les animaux dans les différents groupes de traitement selon leur glycémie basale, une première mesure de glycémie à jeun sera réalisée une semaine après leur réception et une semaine avant le premier traitement oral. Pour cela, les animaux seront mis à jeun la veille en fin de journée (procédure expérimentale 1) et la mesure de glycémie sera réalisée le lendemain matin à l'aide d'un lecteur de glycémie par un prélèvement d'une microgoutte de sang à l'extrémité de la queue (procédure expérimentale 2).

La veille du premier traitement, les animaux seront mis à jeun en fin de journée. Le lendemain matin, les traitements oraux avec les composés à tester et 5 minutes plus tard avec le saccharose seront réalisés (procédure expérimentale 3) puis l'aliment sera mis à disposition des animaux et leur glycémie postprandiale sera mesurée 30 minutes après. Les traitements oraux avec les composés à tester seront ensuite quotidiens pendant deux semaines et la glycémie sera mesurée selon le même mode opératoire une fois par semaine.

4 mesures de glycémie seront ainsi effectuées sur l'ensemble des animaux et les traitements oraux seront effectués pendant 14 jours consécutifs.

Les solutions des 2 composés à administrer aux 2 doses à tester et d'Acarbose seront préparées chaque jour de traitement dans le véhicule adéquat (eau de source en théorie) ainsi qu'une solution de saccharose.

Après la dernière mesure de glycémie, les animaux seront euthanasiés par injection d'une surdose d'anesthésique.

Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement tout au long de l'expérimentation, et si une forte perte de poids (perte de poids de plus de 15% sur 3 jours ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude) ou des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, tremblements, paralysie, vocalises...), ceux-ci seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs dans nos conditions expérimentales et selon un calcul de puissance statistique (Réduction).

**9333** La thérapie génique consiste à corriger une maladie héréditaire par un transfert de gène à l'intérieur des cellules malades, ce qui permettra à l'organisme de fabriquer ses propres médicaments pour lutter contre la maladie. Ce transfert de gène est réalisé à l'aide d'un véhicule ou vecteur issu d'un virus qui a été modifié pour ne plus être pathogène (vecteur recombinant). Les vecteurs viraux recombinants dérivés du virus adeno-associé (rAAV) sont des vecteurs de choix pour le transfert de gène à long terme dans différents tissus. Cependant, l'homme est naturellement exposé au virus et développe une immunité médiée par les anticorps contre la structure externe du virus (la capsid). Ces anticorps neutralisants sont capables de reconnaître des structures similaires sur les vecteurs rAAV et d'entraîner la neutralisation des vecteurs injectés qui ne peuvent donc plus atteindre leur cible et permettre un transfert de gène efficace. Aussi, il a été démontré récemment que les anticorps sont capables d'induire la dégradation des virus à l'intérieur des cellules. Par ailleurs, le tropisme et l'efficacité du transfert de gène peuvent être influencés par d'autres facteurs. Ainsi, il est rapporté que l'AAV a la capacité d'interagir avec des protéines du sérum qui facilitent ou inhibent le transfert de gène. In vitro, nous avons mis en évidence que l'AAV interagit avec des protéines intracellulaires, en particulier avec la protéine ligase x. De façon très intéressante, cette protéine réduit l'expression du transgène véhiculé par l'AAV in vitro, ce qui en fait une cible intéressante pour améliorer le transfert de gène médié par l'AAV. Cependant, la protéine ligase x est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. L'étude de cette protéine dans le processus de reconnaissance et de dégradation du vecteur AAV ne pourra se faire que sur organismes vivants. Ainsi, les modèles animaux sont nécessaires pour évaluer in vivo l'impact de cette protéine sur la reconnaissance de l'AAV pendant le développement animal au cours de plusieurs jours. Cela permet aussi d'évaluer les interactions avec les différents organes et le système immunitaire. Ainsi, seule l'expérimentation utilisant un modèle in vivo mimant le plus fidèlement possible (avec ou sans expression de la protéine ligase x) le microenvironnement cellulaire permettra de répondre à notre problématique. Pour identifier le rôle de la ligase x dans la reconnaissance, la dégradation intracellulaire du complexe AAV vecteur et anticorps et le déclenchement de la réponse immunitaire, nous utiliserons un modèle déficient en protéine ligase x (modèle murin issu des souris C57BL/6). Dans le respect de la règle des 3R, une préévaluation in vitro de l'effet de la protéine ligase x a été effectuée. Par ailleurs, nous allons faire appel à des techniques permettant l'analyse de plusieurs paramètres sur un même prélèvement, comme par exemple l'analyse des ARN et des protéines à partir des mêmes prélèvements tissulaires. Nous aurons également recours à des techniques d'imagerie sur petit animal pour assurer un suivi

longitudinal du vecteur sur les mêmes animaux (suivi dans le temps de l'animal qui reste son propre témoin par le suivi de l'expression du transgène au cours du temps) En vue de réaliser ce projet, nous souhaiterions étudier un total de 890 souris, ce nombre a été calculé et réduit à l'aide d'un test statistique afin d'obtenir des résultats les plus robustes (Réduction). L'utilisation de la souris déficiente en ligase x nous permettra de comparer le phénotype de souris normales et déficientes sur l'expression du transgène suite à l'administration de l'AAV, si notre hypothèse se confirme, ce projet aura un impact important sur les essais précliniques de thérapie génique médiée par le vecteur AAV, notamment sur la réduction de la dose d'AAV à injecter. Chaque animal présentera un tableau de suivi afin de s'assurer de l'absence de souffrance de nos souris. Nous nous attacherons également, dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation combinée d'analgésiques et d'anesthésiques lors des différents prélèvements (sang et tissus). Enfin nous optimiserons l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

**9334** L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque est notamment associée à des problèmes de production, de transport et d'utilisation de l'énergie, qui affectent le fonctionnement non seulement le tissu cardiaque mais également les tissus périphériques et particulièrement les fonctions musculaires. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque. Ce projet vise à caractériser l'impact de voies de biosynthèse de composés intracellulaire impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique cardiaque et la potentialité thérapeutique d'une modulation de celles-ci dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par de simples cultures de cellules cardiaques isolées car l'insuffisance cardiaque implique de nombreuses régulations physiologiques impliquant le système neuro-hormonal, et les organes périphériques, notamment les poumons, les reins et les muscles squelettiques. De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) : (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés, (v) certaines expériences complémentaires seront réalisées sur des cultures primaires. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 200 rats seront nécessaires pour le projet.

**9335** Les traitements pour les patients souffrant de glioblastome (GBM) incluent la chirurgie (pour un peu plus de 60% des cas) et la combinaison de radio- et chimiothérapie (principalement appliquée par l'utilisation de l'agent alkylant temozolomide (TMZ)). Lors d'une étude précédente nous avons mis en place un modèle animal qui récapitule la prise en charge du patient ce qui rend la validation de nouvelles approches thérapeutiques très pertinentes. Ce nouveau modèle nous ouvre maintenant de nombreuses perspectives afin d'utiliser ce modèle dans des applications précliniques originales. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunocompétent ou immunodéprimé afin d'y implanter des cellules tumorales de souris (modèle syngénique) ou humaines, pour reproduire au mieux les conditions de formation de ces tumeurs chez l'homme. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien

des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous veillons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R. En effet avant de réaliser les procédures des études de préliminaires seront réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle in vivo par des modèles in vitro. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier le glioblastome et sa réponse aux traitements. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études in vivo et l'intérêt d'avoir un modèle, à ce jour jamais réalisé, reproductible et mimant toutes les phases d'une radio-chimiothérapie pour l'homme est essentiel pour bien appréhender l'efficacité de nouvelles molécules et ce dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable. Au total 800 souris au maximum seront nécessaires pour cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux sera instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'anxiété qu'ils pourraient éprouver. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux et bénéficieront d'un enrichissement adapté. Pour cela des soins pré-, per- et postopératoires adéquats seront réalisés. Toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie générale et des traitements analgésiques sont systématiquement utilisés pour prévenir toute douleur.

**9336** L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un agent d'occlusion. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau. La technique est par exemple couramment utilisée pour traiter les fibromes utérins en alternative à la chirurgie, ou encore les cancers du foie. Différents types d'agents d'embolisation peuvent être utilisés : billes, colles, spires, etc. Le choix du dispositif dépend principalement du calibre des vaisseaux à boucher. Le médecin doit donc être sûr de la taille des vaisseaux qui vont être occlus par le produit injecté.

L'objectif du projet est d'étudier la distribution dans les vaisseaux de différents types d'agents d'embolisation. Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché.

Les tests doivent être réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes matériels que chez l'homme. Ils sont par conséquent effectués sur des animaux de grande taille, lapin, porc et mouton. L'injection des produits est faite dans l'artère rénale et /ou l'artère hépatique et les animaux seront euthanasiés à la fin de la procédure.

Tous les animaux étudiés dans ce projet proviennent de centres agréés et sont nés et élevés en captivité. L'étude portera sur un nombre maximum de 150 animaux, typiquement 50 lapins, 50 porcs et 50 moutons, pour les 5 années de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R :

Remplacement : Des tests in vitro sont classiquement réalisés dans les premières phases de développement des produits pour déterminer leurs propriétés physiques et éliminer les prototypes ne présentant pas des caractéristiques satisfaisantes. Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent actuellement être modélisées dans des systèmes in vitro : contact avec le sang, déformation des vaisseaux, réseaux vasculaires complexes, ce qui implique le recours à l'animal vivant.

Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données. Ce nombre est classiquement de 2 ou 3 par groupe d'étude. Les deux reins de l'animal sont traités et ou/ deux lobes du foie (latéral gauche et latéral droit), les prélèvements sur chaque organe sont multipliés pour réduire le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement : La procédure d'embolisation est réalisée sous anesthésie générale et analgésie. La procédure est sans réveil.

**9337** Le diabète de type 2 (DT2) est un facteur de risque indépendant de l'insuffisance cardiaque. Divers travaux ont mis en évidence un dérèglement cardiaque du métabolisme glucidique. Nous avons récemment décrit une cardiomyopathie incluant une hypertrophie ventriculaire gauche et une dysfonction diastolique chez des souris diabétiques seipine KO (SKO). Ces dysfonctions sont associées à une augmentation de l'internalisation du glucose dans le cœur. Le traitement des souris

SKO avec un inhibiteur du transporteur SGLT2 (SGLT2i) qui abaisse la glycémie, a amélioré la fonction cardiaque. Le but de notre projet est d'étudier les mécanismes cardioprotecteur des SGLT2i. A l'aide des souris SKO et d'un autre modèle de DT2, nous allons déterminer les paramètres cardiaques qu'ils améliorent ainsi que leur implication dans un processus de modification post-traductionnelle des protéines : la O-GlcNac. La O-GlcNac est liée à la concentration en sucre dans les tissus et nous avons précédemment observé son augmentation chez les souris Bslc2-/- . Notre approche va nous permettre d'éclairer les effets systémiques des SGLT2i, leurs voies d'action et leurs conséquences au niveau cardiaque.

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre de 406 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Nous avons précédemment défini la cinétique minimale de traitement aux SGLT2i et donc raffiné le nombre d'animaux et le temps de l'expérimentation. Nous avons pris en compte le bien-être animal, un examen régulier permettra de prévenir les risques de stress et de souffrances. Nous avons intégré la gestion de la souffrance animale en utilisant les analgésiques adaptés à chaque procédure. Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées mais nous effectuerons plusieurs études en cultures cellulaires afin de remplacer au maximum l'utilisations des souris.

**9338** L'obésité est considérée comme épidémie mondiale. Plus de la moitié des français sont en surpoids et parmi eux, environ 70% présentent un foie gras (stéatose hépatique) qui peut évoluer en stéatohépatite, propice aux cirrhoses/cancers. Bien que les mécanismes de cette progression restent à clarifier, l'exposition aux produits chimiques est suspectée notamment l'alcool, le benzo(a)pyrène (B[a]P) et le phtalate de bis(2-éthylhexyle) [DEHP]).

Dans ce contexte, la larve de zebrafish (*Danio rerio*) a été identifiée comme un modèle de choix car (i) il s'agit d'un organisme entier présentant les interactions entre organes et cellules, impossible à reproduire *in vitro* (Remplacement) ; (ii) il est proche de l'homme, en particulier au niveau du foie.

Financé par l'ANR, ce projet est en continuité avec un projet antérieur qui a montré que la co-exposition alcool et BaP chez des larves présentant une stéatose favorisait la progression vers la stéatohépatite. Ces travaux ont permis d'identifier 7 agents potentiellement protecteurs) que le projet actuel vise à confirmer. Pour cela, des larves seront alimentées avec un régime témoin ou un régime enrichi en graisse (inducteur de stéatose) avant d'être exposées à un agent toxique (B[a]P ou DEHP), seul ou en combinaison avec l'alcool. En parallèle, certaines larves seront traitées avec l'un des 7 agents protecteurs. Afin de limiter le nombre d'animaux (Réduction), tout en s'accordant avec les possibilités techniques, le plan d'expérimentation suivant a été conçu : Pour une ponte (autour de 3300 larves), il sera possible de tester les effets d'un agent toxique et d'un agent protecteur. Afin de s'affranchir des effets liés à la variabilité entre ponte, chaque expérience sera reproduite sur 3 pontes différentes. Au total, 42 pontes (2 toxiques x 7 agents protecteurs x 3 pontes) réparties sur 4 ans seront nécessaires et en prenant en compte les risques de perte, cela a permis d'estimer un nombre total de 45 pontes pour les 4 années de ce projet (soit environ 148500 larves de moins 2 mg chacune). Les larves seront élevées dans les conditions optimales préconisées et tous changements de comportement/santé seront surveillés en respect avec les points limites fixés (Raffinement). Les procédures expérimentales jugées comme pouvant induire un stress ou une douleur excessive seront réalisées en présence d'un composé anesthésique et antalgique (Raffinement).

**9339** La Maladie d'Alzheimer (MA) est un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aujourd'hui aucun traitement capable de contrecarrer l'évolution naturelle de la maladie. La découverte d'un nouveau traitement (seuls 4 médicaments peu efficaces actuellement sur le marché) pourra être considérée comme une révolution que ce soit en termes de nombre de patients (actuellement 26 millions de cas dans le monde; 65 millions en 2030 en l'absence de nouveaux traitements. 870.000 cas en France) qu'en termes humains (répercussions sur la santé des conjoints) et financiers pour le système de santé. Nous avons déjà démontré l'efficacité d'une approche thérapeutique basée sur une thérapie génique



qui consiste en l'administration d'un gène thérapeutique (impliqué dans le métabolisme du cholestérol) au moyen d'un vecteur viral par administration directe dans le cerveau.

Le but de notre projet est d'optimiser cette approche thérapeutique chez un modèle rongeur (souris) en injectant le vecteur viral par voie intraveineuse et ainsi de diminuer considérablement le risque chirurgical. Le bénéfice thérapeutique attendu est une amélioration de la mémoire. A terme, nous souhaitons proposer un essai clinique pour les patients souffrant de MA.

Remplacement : nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris) car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne permet aujourd'hui d'étudier les symptômes de perte de mémoire typique de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de MA bien caractérisé tant d'un point de vue comportemental que biologique (marqueurs histologiques ou moléculaires) pour évaluer le bénéfice thérapeutique associé à notre approche. Pour ce faire, nous utiliserons au maximum 3 modèles de MA déjà décrits.

Raffinement : En cas d'observation de la moindre douleur ou inconfort, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, après consultation du concepteur et du vétérinaire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction : enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques fiables. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de vecteurs viraux à injecter, les temps d'analyses. Ils ont également montré que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 228 souris.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés dans des établissements reconnus. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux.

**9340** L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est donc un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'il provient de l'occlusion d'une artère cérébrale. Ce projet de recherche translationnelle, d'une durée de quatre ans, prévoit l'évaluation de 2 procédures visant à protéger le tissu cérébral (neuroprotection) au stade aigu (dans les premières heures) d'un AVC ischémique.

A ce jour, aucun traitement neuroprotecteur n'a démontré d'efficacité chez l'homme. Nous souhaitons évaluer 2 nouvelles stratégies de neuroprotection : premièrement, le conditionnement ischémique à distance, qui consiste à infliger une brève ischémie contrôlée à un membre périphérique afin de stimuler la sécrétion de facteurs endogènes protecteurs, deuxièmement, une légère inclinaison prolongée du corps (tête en bas) afin de promouvoir la circulation cérébrale collatérale (autour de la zone ischémisée). Ces 2 stratégies ont l'intérêt d'être non pharmacologiques et faciles à mettre en place dès le transport du patient vers l'hôpital. Toutes deux ont déjà été étudiées, y compris par nos collaborateurs. La valeur ajoutée de ces nouvelles procédures réside dans l'apport de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui permet d'homogénéiser les groupes d'animaux selon la taille de l'infarctus ischémique et de mesurer in vivo la perfusion cérébrale.

Avantages potentiels du projet.

L'évaluation de nouveaux traitements chez l'animal est une étape nécessaire pour pouvoir concevoir correctement de futurs essais cliniques.

Effets néfastes attendus sur les animaux.

L'induction d'un AVC nécessite une procédure de classe sévère avec chirurgie et déficits sensorimoteurs persistants. En conséquence, il sera établit une grille de score) associée aux points limites pré-définis, afin de limiter au maximum la souffrance des animaux. Le suivi post-AVC sera limité à 24h, et immédiatement suivi de l'euthanasie des animaux. Une analyse rétrospective sera menée au terme de ce projet d'expérimentation animale.

Application de la règle des 3R.

Remplacement. Ce projet sur animaux vivants s'appuie sur des données in vitro déjà publiées. Leur utilisation est justifiée par le rôle central de l'imagerie in vivo dans ces procédures. Le projet utilisera

des rongeurs, 40 rats au maximum, plutôt que des animaux de plus grande taille (chats, primate) grâce à l'utilisation d'appareils d'imagerie dédiés aux petits animaux.

Raffinement & Réduction. L'imagerie in vivo permet un suivi longitudinal sans avoir à euthanasier les animaux à intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux.

**9341** Dans un contexte sociétal progressiste, le bien-être animal a pris une place prégnante. De nombreuses questions, en particulier pour les des comités d'éthique, se posent sur la gestion de la douleur au cours d'un processus infectieux induit expérimentalement. Des outils d'observation sont mis en place pour évaluer cette douleur (scoring sur le faciès). La mise en place de médicaments de type antalgiques ou analgésiques par exemple permettent de soulager une douleur expérimentale. Cela a été démontré chez certains modèles animaux dans le cadre d'études comportementales. Cependant, ces antalgiques ou analgésiques ne doivent pas perturber le développement de la pathologie chez son hôte, pour ne pas modifier la question scientifique initiale. Actuellement dans nos processus infectieux, l'utilisation de ces médicaments est mal connue, ainsi que leurs conséquences sur la physiopathologie de l'agent infectieux, sur la réponse immunitaire induite (inné ou acquise) et sur le recrutement cellulaire de l'hôte. Nous utiliserons le modèle expérimental murin pour étudier l'impact du paracétamol sur les réponses immunitaires induite et comportementale lors d'une toxoplasmose aiguë et chronique chez la souris. La toxoplasmose est une maladie infectieuse cosmopolite due à un protozoaire intracellulaire, parasite opportuniste, *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmose congénitale représente un problème majeur de santé publique et vétérinaire. Environ 3000 femmes enceintes s'infectent chaque année en France avec, dans 10% des cas, une transmission transplacentaire du parasite au fœtus. En parallèle, elle est l'une des causes majeures d'avortements pour les petits ruminants au sein des élevages français. Le projet a pour but de savoir si le paracétamol interagit ou pas sur la réponse immunitaire induite lors d'une toxoplasmose aiguë et chronique chez la souris. De nouveaux outils seront mis en place pour évaluer le comportement de la souris durant l'infestation (vidéos, tests de comportement). Parallèlement, des analyses immunologiques réalisées seront réalisées afin de vérifier l'impact du paracétamol sur la réponse immunitaire. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 375 souris dans le respect de la règle des 3R et afin d'établir les premières études de l'utilisation du paracétamol au cours d'un processus infectieux.

- Remplacement : Il n'y a pas de modèles in vitro alternatifs.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en animalerie A2 en atmosphère contrôlée, à raison de 3 souris par cage et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites.

**9342** Les réactions allergiques cutanées telles que les eczémas de contact sont des pathologies inflammatoires affectant le quotidien et la qualité de vies des patients mais également leur quotidien professionnel. Les traitements sont soit des anti-inflammatoires ou bien dans le cas des pathologies professionnelles, il faut songer à l'aménagement de nouveaux postes. Il faut donc prévenir les allergies et trouver des solutions pour les contrôler.

La protéine Nrf2 pourrait être ce candidat car elle est décrite comme une molécule anti-inflammatoire jouant un rôle dans de nombreuses pathologies. Par ailleurs, il est assez aisé d'induire cette molécule par des produits naturels. Si dans une étude précédente, nous avons pu montrer que cette protéine Nrf2 contrôle la réponse inflammatoire cutanée, nous n'avons à ce jour aucun mécanisme de cette protéine dans la réponse cutanée. Nous ne savons pas quelles sont les cellules cutanées régulées par Nrf2. Par ailleurs, aucune donnée n'existe quant au rôle de Nrf2 dans la qualité du microbiote si important dans le contrôle des allergies.

Pour aborder cette problématique, nous identifierons les cellules immunitaires cutanées contrôlées par la protéine Nrf2. Puis, nous adresserons le rôle du Nrf2 dans la composante du microbiote.

Les souris seront sensibilisées une ou quatre fois au maximum, au niveau de l'oreille ou du flanc, avec une molécule chimique allergisante diluée suffisamment afin de ne pas irriter la peau de l'animal. La molécule allergisante n'engendrera qu'un léger gonflement de l'oreille sans incidence sur le bien-être ni la santé de l'animal. Les animaux seront conservés dans un état de bien-être optimal.

Pour l'ensemble de ce projet de 5 ans, 1000 animaux seront utilisés et répartis sur 3 procédures différentes. Pour ne pas utiliser trop d'animaux, tous les organes d'un même animal seront prélevés pour optimiser. Par ailleurs, des mesures historiques de témoins nous permettront de réduire l'effectif de ces groupes. Sachant que les cellules immunitaires sont issues de la moelle osseuse et migrent dans les organes via le sang, nous aurons l'avantage de travailler sur un même animal pour prélever tous les organes au sein d'une même souris. Ceci présente l'avantage de générer une quantité de données importantes pour chaque animal, et en limiter ainsi le nombre.

Modéliser la peau est envisageable car il existe des modèles 3D de peau mais aucun d'entre eux ne prend en compte le système immunitaire de la peau. Au regard de la complexité du système immunitaire ainsi que l'étude de la migration des cellules immunitaires d'un organe à l'autre, le modèle animal est incontournable. Les méthodes alternatives actuelles ne permettent pas à ce jour d'être utilisées pour cette étude.

En résumé, ce travail permettra d'identifier le rôle de Nrf2 dans les cellules immunitaires et de savoir si le microbiote et Nrf2 interagissent dans le contrôle de la réponse allergique. Les résultats pourront être cruciaux dans l'élaboration pertinente de modèle 3D

**9343** Le paraquat est un herbicide reconnu comme un facteur de risque de la maladie de Parkinson chez l'homme. Pourtant en laboratoire, chez la souris, ses effets sur le cerveau sont parfois limités et très variables selon les études. Certaines études montrent qu'un tel effet peut-être plus évident chez des souris auxquelles on a administré peu avant l'exposition au paraquat (2 jours) du lipopolysaccharide, une substance d'origine bactérienne, qui entraîne une inflammation dans le cerveau. Notre projet, utilisant un total de 80 souris, est une étude pilote qui vise à évaluer dans quelle mesure ceci peut être vérifié chez des souris génétiquement modifiées pour produire une protéine humaine, l'alpha-synucléine. Le projet représente une étude pilote afin de confirmer des données en partie publiées dans des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson chez la souris, qui concernent la synergie de l'expression d'une protéine humaine surexprimé chez des souris transgéniques et d'un phénomène neuroinflammatoire induits dans les tissus de l'hôte par le lipopolysaccharide. Ces travaux ne peuvent en conséquence être menés ex vivo. Cette protéine est en effet présente sous une forme agrégée dans les lésions cérébrales des patients atteints de la maladie de Parkinson. Après une injection intra-abdominale de lipopolysaccharide à de telles souris (ou pas), trois injections intra-abdominales de paraquat seront réalisées à une semaine d'intervalle. Ces animaux sont hébergés dans un environnement enrichi. Le suivi clinique des animaux est réalisé quotidiennement et leur état de santé est évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel. Cette grille nous permet d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès l'apparition des premiers signes de souffrance (point limite fixé). Les souris sont euthanasiées une semaine après la dernière injection de paraquat. Les prélèvements réalisés permettront d'étudier les modifications moléculaires concernant l'agrégation de l'alpha-synucléine et l'inflammation du cerveau. Cette étude permettra ainsi de déterminer les modifications associées aux injections de paraquat et de savoir si ces modifications sont plus importantes après une injection préalable de lipopolysaccharide.

**9344** Le projet vise à mieux comprendre les expressions de l'état émotionnel des chevaux pendant les activités qu'ils réalisent au quotidien. Les résultats de ce projet pourront donner des nouvelles pistes sur la gestion des interactions avec les chevaux. Ils pourront également établir les critères de bien-être du cheval à respecter, en proposant des outils qui permettront leur application. En dernier, le projet permettra aux vétérinaires praticiens de retrouver des indicateurs fiables pour une évaluation comportementale et du bien-être de l'animal. L'espèce visée sur ce projet est l'*Equus caballus*, donc les équins domestiques, qui appartiennent à un propriétaire et qui participe au quotidien dans une ou plusieurs disciplines d'équitation ou dans le travail qui peut être demandé à ces animaux, comme par exemple dans des fermes. Ceci dit, les animaux qui participeront à ces études seront amenés à réaliser des activités qu'ils font déjà au quotidien, c'est-à-dire qu'aucun changement de leur vie au

quotidien ne sera envisagé (remplacement). En revanche, des prises de sang sont essentielles à la réalisation de ce projet pour assurer que l'animal se retrouve en bon état de santé et pour rechercher des paramètres physiologiques associés au stress dans cette espèce. Pour réduire la réalisation des prises de sang par animal, une prise de sang unique sera réalisée par un vétérinaire expérimenté avant le début des expériences. Les résultats d'analyse du sang prélevé seront mis à disposition des propriétaires des chevaux, ce qui évite une deuxième prise de sang pour les contrôles annuels de l'état de santé des animaux réalisés par les vétérinaires traitants (raffinement). Ils seront environ 100 animaux pour la participation dans ce projet et pour toute la durée de celui-ci. Chaque cheval passera entre 2 à 3 expérimentations, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux qui participeront dans le projet (réduction). La participation de chaque cheval dépend de son état émotionnel et physique. Une fois terminé leur participation à l'essai, les chevaux reprennent leur vie normale avec leurs propriétaires. Un consentement éclairé, que sera signé par les propriétaires des chevaux et par le vétérinaire en charge de cette recherche, sera transmis au propriétaire avec toutes les informations concernant les manipulations de leurs animaux.

**9345** Le projet que nous proposons s'intègre dans le cadre général des recherches menées par notre équipe dont l'objectif principal de mieux comprendre le rôle des neuropeptides apparentés à l'urotensine II (urotensin II-related peptides ou URPs). Pour cela nous utilisons comme modèle d'étude le poisson-zèbre qui, au cours de ces dernières années, s'est imposé comme un modèle de choix pour l'étude des fonctions des neuropeptides.

L'objectif de notre projet est de tester l'impact de l'activité locomotrice sur l'expression de certains neuropeptides. La complexité de ce type de comportement et de ses liens avec les sécrétions du système nerveux sont tels qu'ils ne peuvent pas être reproduits *in vitro* et nécessitent par conséquent de recourir à des organismes vivants.

Chez les mammifères, une seule forme d'URP appelée URP0 est connue, alors que chez les poissons comme le poisson-zèbre, il peut en exister jusqu'à trois, appelées URP0, URP1 et URP2. Les fonctions des URPs aussi bien chez les mammifères que chez les poissons sont actuellement inconnues. Toutefois, le fait que les URPs soient majoritairement exprimés par des neurones bien documentés pour leur implication dans les fonctions motrices (motoneurones et neurones contactant le liquide céphalorachidien) suggère que ces peptides pourraient être eux-mêmes impliqués dans le contrôle de l'activité locomotrice. A l'appui de cette hypothèse, des études réalisées chez la truite ont effectivement montré que l'injection des URPs augmente l'activité motrice de poissons. Le projet que nous soumettons vise à tester cette hypothèse par une approche différente en utilisant comme modèle une lignée mutante de poisson-zèbre dépourvue de nageoires.

Notre projet se base sur des travaux non encore publiés, réalisés il y a quelques années par une approche immunohistochimique, qui ont montré que l'expression de certains URPs est plus élevée chez des poissons d'une lignée mutante homozygote dépourvus de nageoires (mutant «finless») que chez des poissons hétérozygotes ou sauvages. Du fait de leur absence de nageoires, les poissons homozygotes affectés par la mutation «finless» présentent une activité de nage beaucoup plus intense (vraisemblablement par nécessité de compensation). Ces travaux, compte tenu des limitations de la technique utilisée, n'ont pas permis de préciser la nature des URPs concernés. Ils suggèrent néanmoins l'existence d'une corrélation entre l'intensité de l'activité motrice des poissons et le niveau d'expression des URPs.

Afin d'identifier et de valider ces résultats préliminaires et, en particulier déterminer la nature des URPs dont l'expression est affectée chez les mutants «finless», le projet que nous proposons vise à reprendre les travaux déjà réalisés mais en utilisant cette fois des techniques plus spécifiques et plus quantitatives, l'hybridation *in situ* et la RT-PCR quantitative. La mise en œuvre de ce projet nous impose de pouvoir maintenir en élevage des mutants hétérozygotes «finless» afin de pouvoir produire des mutants «finless» homozygotes, au phénotype délétère au sein de notre animalerie.

Notre projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R. Réduction : La production d'animaux est réduite au maximum de façon à atteindre les objectifs. Pour chaque condition, nous utiliserons un total de 10 animaux pour les RT-PCR quantitatives et 5 pour les hybridations *in situ*. La significativité statistique des résultats sera déterminée à l'aide du test two-way ANOVA qui permet de prendre en compte différents paramètres, comme le génotype et le stade de développement. Les animaux sont

l'objet d'un suivi quotidien et tout animal présentant des signes de maladies est euthanasié pour éviter toute propagation. Dès que le phénotype altéré "finless" commence à s'exprimer, c'est à dire après 3-4 semaines de développement, les animaux présentant la mutation sont séparés de leurs congénères sauvages ou hétérozygotes qui ont tous un phénotype normal. Cette séparation garantit le placement des animaux dans les conditions optimales de bien-être et limite, compte tenu de l'absence de stress, l'utilisation possible d'animaux à un nombre total de 250 mutants homozygotes. Dans l'optique de chercher à démontrer une corrélation entre activité locomotrice et expression des URPs, l'utilisation des mutants «finless» est une opportunité. En effet, ces animaux présentent un défaut naturel de nage sans que celui-ci nécessite une approche expérimentale par des moyens chirurgicaux (par ex. ablation des nageoires) ou par des moyens pharmacologiques (par ex. utilisation de drogues paralysantes), potentiellement beaucoup plus invasifs et/ou douloureux.

**9346** La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle sera bientôt la 4ème cause de mortalité. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, associée à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. L'évolution chronique de la BPCO est aggravée par des épisodes d'exacerbations, qui participent au remodelage bronchique. Les mécanismes du remodelage sont mal compris, et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Nous avons récemment mis en place au laboratoire un modèle de souris BPCO, dans lequel les souris sont exposées à la fumée de cigarette pendant 10 semaines et à des injections de poly-(IC) pendant la seconde moitié du protocole. Pour le moment, l'analyse de la fonction ventilatoire des animaux est réalisée à la fin du protocole sur souris anesthésiées et trachéotomisées, et il est donc impossible d'effectuer des études longitudinales dans notre modèle. Le but de ce projet est de mettre en place et de valider une méthode d'analyse de la fonction respiratoire dans des souris intubées, afin d'effectuer le suivi de la fonction respiratoire des souris incluses dans le protocole de souris BPCO.

Nous pensons que la réalisation de ce projet permettra d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 444 souris seront utilisées.

Afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), les mesures mises en place sont les suivantes :

1) Réduire : se souciant de réduire le nombre des animaux en expérimentation, nous avons calculé le nombre de souris minimal par groupe pour obtenir des résultats significatifs, et nous réaliserons de multiples études ex vivo sur différents organes et selon différentes techniques.

2) Raffiner : pour diminuer la souffrance et l'anxiété des animaux, des dispositifs sont prévus (anesthésie pour les intubations et les prélèvements, analgésie locale pour les prélèvements, raffinement des conditions d'hébergement, vérification par le comité sur le bien-être des animaux) et nous avons soigneusement décrit des points limites en relation avec notre protocole (critères de perte de poids, comportement anormal ou difficulté respiratoire).

3) Remplacer : il n'existe pas de modèle in vitro actuellement permettant d'étudier le rôle des fibrocytes dans la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique, l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO et la mise en place de cette nouvelle méthode d'analyse de la fonction respiratoire de façon non invasive, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

**9347** Le cancer du foie constitue la deuxième cause mondiale de morts liées au cancer. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) en constitue la forme primitive la plus fréquente avec environ 500 000 nouveaux cas/an. Il survient sur des foies malades, touchés par des hépatites virales ou toxiques (alcool) ou des foies gras à cause de maladies métaboliques (obésité en particulier). Le pronostic du CHC reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%. La chirurgie est le principal traitement curatif mais seule une minorité de patients (<40%) peut en bénéficier et le traitement palliatif du CHC non opérable n'a qu'une efficacité très modérée avec seulement quelques mois de survie supplémentaire.

Il paraît donc essentiel de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués afin de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Nous travaillons sur la mutation génétique la plus fréquente dans le CHC humain qui conduit à l'activation d'un oncogène, mutation que nous avons reproduite par un modèle murin transgénique. Des études antérieures ont pu identifier 6 gènes impliqués dans le processus tumoral. Pour estimer leur implication dans la survenue et la progression des CHC, notre stratégie sera de les invalider.

Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés tout en permettant une analyse statistique valable. Nous prévoyons l'utilisation de 1045 animaux sur 5 ans pour mener à bien ce projet.

Notre projet s'appuie sur des résultats *in vitro*, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement tumoral qui est le résultat d'interactions complexes entre la tumeur, son tissu d'origine et son environnement.

Pour les invalidations géniques, nous utiliserons une technique innovante et validée qui évite la création de lignées et les nombreux croisements permettant leur maintien, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés aux seuls animaux nécessaires à l'expérimentation.

Les protocoles d'induction de tumeur hépatique que nous utilisons sont soit génétiques, soit chimiques, soit métaboliques, mais n'entraînent pas de souffrance.

Nous suivrons le développement des tumeurs par échographie, dans un autre établissement utilisateur situé sur le même site. Cette technique non invasive permet un suivi longitudinal en évitant les souffrances engendrées par un développement tumoral important puisque les études sont réalisées à des stades précoces, sur de petites tumeurs. Afin d'affiner la surveillance des animaux en surveillant les éventuels effets délétères de l'altération générée sur le foie, des biopsies hépatiques sont prévues dès l'apparition des tumeurs. Il s'agit de réaliser une chirurgie légère, sous anesthésie générale et avec administration d'antalgiques, pour réduire au maximum la douleur.

Les injections et les prélèvements sanguins seront également réalisés sous anesthésie générale.

En conclusion, notre hypothèse est que les 6 gènes que nous souhaitons inactiver dans le foie normal ou cancéreux ont une importance majeure dans la cancérisation du foie. Ils pourraient donc être la source de pistes thérapeutiques. La mise en œuvre de notre projet permettra de répondre à cette question, rendue cruciale par le fait que le CHC manque cruellement d'options thérapeutiques à ce jour.

**9348** Au-delà du contrôle bien connu de la parturition, l'ocytocine a un rôle primordial dans la modulation des comportements sociaux et de l'anxiété, et dans la protection du système cardiovasculaire. Les acteurs impliqués dans les mécanismes de la libération d'ocytocine restent peu connus. Les neurones des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus utilisent à la fois le  $Ca^{2+}$  extracellulaire et celui stocké dans des organites intracellulaires comme source de  $Ca^{2+}$  pour la sécrétion d'ocytocine. Notre projet a donc pour but d'étudier le rôle d'un nouveau canal calcique intracellulaire dans la sécrétion d'ocytocine. Pour cela nous avons généré des souris qui n'expriment plus ce canal, ce qui a entraîné un déficit d'ocytocine plasmatique. On ne peut pas utiliser des lignées cellulaires car nous nous intéressons à des réseaux neuronaux complexes d'une structure cérébrale précise, l'hypothalamus et ces expériences sont associées à des études sur le comportement animal. Le suivi des troubles autistique et l'évaluation des effets protecteurs l'ocytocine dans un organisme ne peut se faire que sur un modèle animal (la souris TPCs<sup>-/-</sup>). Nous allons étudier par quels mécanismes ces canaux contrôlent la sécrétion de l'ocytocine synthétisé au niveau de l'hypothalamus et nous testerons l'hypothèse décrite dans la littérature d'une sécrétion au niveau du cœur. Nous déterminerons également si ces défauts de sécrétion sont à l'origine du phénotype comportemental observé (anxiété, diminution des émissions de vocalisations, altérations des comportements sociaux et maternels). Ce projet permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies liées à un déficit en ocytocine telles que l'autisme ou des troubles de la fonction cardiaque. Ainsi, nous avons mis en place un protocole expérimental permettant de réduire au maximum le nombre de souris nécessaire. Il nous faudra étudier 1845 souris au maximum pour garantir la validité statistique de l'étude réalisée sur 3 ans (le nombre sera réduit tant que possible). A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour cette étude selon les références européennes officielles (European Union Reference Laboratory for Alternatives to

Animal Testing). Dans un souci de raffinement, nous allons veiller au bien-être des animaux qui seront élevés en milieu enrichi.

Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer ou limiter toute souffrance physique des souris et les souris seront surveillées pour évaluer d'éventuelle souffrance, détresse ou inconfort. Ce suivi comporte une évaluation de la perte de poids, de l'apparence physique et du comportement de l'animal.

**9349** Les enfants atteints de dermatite atopique présentent un risque accru de développer un asthme (40%). C'est ce qui est appelé la « marche atopique ». La dermatite atopique ou eczéma est une manifestation inflammatoire cutanée récidivante chez des individus présentant un terrain, une prédisposition génétique à présenter des réactions excessives aux allergènes. Cette pathologie apparaissant chez le petit enfant (1-6 mois) est dans un fort pourcentage suivie d'asthme à un âge plus avancé (2-4 ans) puis par une rhino-conjonctivite.

Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements efficaces et présentant moins d'effets secondaires.

Notre objectif est d'évaluer l'activité de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans un modèle de marche atopique (réaction inflammatoire cutanée potentialisant l'apparition d'un asthme) chez la souris, dans le but de mettre en évidence des traitements de l'inflammation au niveau cutané et de prévenir ou réduire le développement ultérieur de l'asthme.

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

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale répond aux administrations d'allergène par une réponse inflammatoire de type allergique des voies aériennes suite à une sensibilisation cutanée et qui permet l'étude des cibles thérapeutiques. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier une réaction allergique de type asthmatique. Pour cette raison, une approche in vivo est nécessaire pour valider l'intérêt de la cible.

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. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 6 à 10, dans des grandes cages 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, de 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 pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait l'euthanasie 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 de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir un modèle reproductible avec 8 souris par groupe.

Nous proposons d'utiliser un protocole utilisant : un groupe témoin, un groupe contrôle recevant le candidat-médicament à la plus forte dose, un groupe témoin de la marche atopique, et un/des groupe/s thérapeutique/s avec administration du candidat-médicament, à une/des doses croissantes dans le modèle de marche atopique.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 6 candidats-médicaments à une dose unique par an (soit un maximum de 8 souris x 4 groupes = 32 souris, un total de 192 souris par an pour 6 candidats

médicaments). L'activité des 2 à 3 candidats médicaments les plus actifs sera étudiée plus précisément en utilisant des doses croissantes (l'effet sera mesuré à 3-5 doses, soit un maximum de 8 souris x 8 groupes = 64 souris par candidat médicament, un total de 192 souris pour 3 candidats-médicaments par an). Nous envisageons donc l'utilisation d'un maximum de 1920 souris sur une période de 5 ans.

**9350** Ce projet a pour objectif d'évaluer les effets d'une nouvelle molécule ayant un effet sur la microcirculation. En effet dans certaines pathologies, tel que le diabète, une altération de la microcirculation cutanée peut engendrer des troubles (retard de cicatrisation, problème d'oxygénation tissulaire...). La microcirculation est un élément central altéré dans ces pathologies. L'utilisation de drogues afin d'améliorer ces fonctions représente aujourd'hui une méthode thérapeutique à développer. Cette molécule agit sur la vasodilatation et a donc un effet bénéfique sur la microcirculation. Cette étude a pour but de définir une dose ainsi qu'une voie d'administration optimale ainsi qu'une étude de toxicologie. Pour y parvenir, nous utiliserons deux souches murines (C57BL6 « souris saines » et BKS « souris diabétiques ») pour un total de 190 animaux. Ce nombre tient compte de la règle des 3 R : Remplacement : impossible dû à l'interaction systémique possible de la molécule.

Réduction : choix du nombre d'animaux utilisé minimum aux vues des besoins de l'étude

Raffinement : toutes mesures de baisse ou de limitation de la souffrance animale sont prises en compte (analgésie, antalgie).

**9351** Les papillomavirus humains (HPV) sont de petits virus à ADN responsables d'infections sexuellement transmissibles et d'infections localisées de la peau et des muqueuses. Il en existe plus de 150 différents et certains peuvent provoquer des cancers. Les manifestations cliniques des infections à HPV sont variées et leur responsabilité des HPV est incriminée dans environ 5 % de la totalité des cancers. Le cancer du col de l'utérus devient actuellement le premier cancer de la femme africaine, qui est souvent multi-infectée, très jeune et qui vit désormais plus longtemps, ce qui favorise le développement de lésions cancéreuses du cervix.

Deux vaccins prophylactiques existent à ce jour :

- Le premier est utilisé pour la prévention des infections à génotypes 16 et 18 ;

- Le deuxième est utilisé pour la prévention des infections à génotypes 6, 11, 16 et 18, élargi aujourd'hui à la protection aux génotypes 31, 33, 45, 52 et 58.

En France en 2018, la vaccination est recommandée chez la jeune fille, avant l'âge des rapports sexuels (11-14 ans), et entre 15 et 19 ans en rattrapage. Le vaccin a pour objectif à terme de réduire l'incidence des cancers cervicaux, mais aussi les incidences des autres cancers associés aux HPV, notamment les cancers anaux et de la gorge.

L'efficacité du vaccin repose sur la production et la persistance d'anticorps neutralisants ciblant les différents types d'HPV, par l'injection de glycoprotéines de surface L1, obtenues pour le deuxième vaccin à partir d'ADN recombinant intégré dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le deuxième vaccin existant contient par ailleurs 225 µg d'hydroxyphosphate d'aluminium utilisé comme adjuvant pour stimuler l'immunité et 500 µg pour le vaccin élargi à un plus grand nombre de génotypes.

En 2012, a été rapportée la présence de séquences d'ADN L1 du génome viral HPV dans 16 lots de vaccin HPV provenant de pays différents. Cette présence est a priori anormale, puisque ce vaccin est un vaccin protéique recombinant.

En 2017 et 2018, nous avons reproduit les travaux de 2012 et nous les avons ensuite élargis au vaccin couvrant un plus grand nombre de génotypes.

Nous avons mis en évidence la présence d'ADN L1 HPV dans TOUTES les ampoules étudiées (n=6 et n=5 respectivement, par différentes techniques d'analyses (PCR).

Il a été possible de mesurer précisément la quantité d'ADN L1 résiduel en nombre de copies par ampoule de vaccin à 17952 et 7015 copies d'ADN L1.

La présence de séquences résiduelles d'ADN L1 dans les ampoules de vaccin provient très probablement d'un défaut de purification au moment de la fabrication du vaccin. Cette présence est anormale, d'autant que la quantité de molécules d'ADN L1 est relativement importante, de l'ordre de 25 copies par µl de vaccin.



La signification de cet ADN L1 résiduel au procédé de fabrication du vaccin est actuellement inconnue. Lee a montré que ces ADN résiduels avaient une conformation apte à favoriser leur liaison très étroite à l'hydroxyphosphate d'aluminium (adjuvant présent dans les ampoules de ce vaccin). Une hypothèse émise, non vérifiée, est que la persistance de ces ADN L1 résiduels associés à un adjuvant de l'immunité pourrait être à l'origine de désordres immunitaires. Une autre hypothèse, également non vérifiée, est que ces ADN L1 résiduels seraient éliminés rapidement dans le tissu musculaire injecté, et que, finalement, ils n'auraient pas de signification pathologique.

Seule une étude expérimentale in vivo chez l'animal permettra de trancher entre ces deux hypothèses : élimination rapide ou persistance, et donc conséquences délétères potentielles ou absence d'effets.

Nous nous proposons ainsi d'évaluer la cinétique de l'élimination des séquences résiduelles d'ADN du gène L1 de HPV de l'un des vaccins prophylactiques commercialisés et de l'hydroxyphosphate d'aluminium (adjuvant), étroitement associé à ces séquences, après injection intramusculaire chez la souris, sur un effectif total de 20 animaux adultes femelles.

L'intérêt de ces travaux pour le grand public est important :

- Si l'ADN résiduel L1 est rapidement éliminé in vivo, il est probable que cette contamination n'a pas de conséquences particulières, ce qui constitue en soi un argument rassurant ;

- Si l'ADN résiduel L1 n'est pas éliminé in vivo, le risque de manifestations auto-immunes et donc de conséquences délétères existe à cause de la persistance en ADN du gène L1 de HPV dans l'organisme au contact d'un puissant adjuvant de l'immunité.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la persistance de séquences d'ADN résiduels et d'adjuvant à base d'aluminium ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude in vitro. La souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant la variabilité interindividuelle. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

**9352** La thrombose est la principale cause de morbi-mortalité des patients souffrant de néoplasies myéloprolifératives (NMP), pathologies affectant le système circulatoire. La thrombose peut être définie comme la formation d'un caillot (thrombus) dans un vaisseau sanguin conduisant à son obstruction. Ce caillot est la résultante d'une adhésion dérégulée entre les cellules sanguines et les cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins. Toutefois, la physiopathologie de la thrombose n'est pas encore totalement élucidée. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous sommes focalisés sur le rôle d'une mutation (JAK2V617F) au sein des polynucléaires neutrophiles (une sous-population de cellules sanguines) et des cellules endothéliales, dans le phénomène thrombotique.

Dans une optique de remplacement/réduction, nous avons réalisé des séries d'études conceptuelles in vitro, dont les conclusions suggèrent que ces cellules ont un phénotype pro-thrombotique. Ces résultats ouvrent la voie à l'étude des interactions cellules sanguines /cellules endothéliales dans un modèle plus complexe mimant notre système sanguin humain. Dans cette optique, nous utiliserons différentes souches de souris portant la mutation JAK2V617F au sein des cellules sanguines ou endothéliales. Nous étudierons les interactions entre ces cellules ainsi que la formation de thrombus en se plaçant dans un contexte d'inflammation légère à l'aide d'une faible dose d'une cytokine pro-inflammatoire : le TNF-alpha. La formation de thrombus sera étudiée 4 heures après dans un modèle d'induction de la thrombose. Les interactions entre différentes populations de cellules sanguines et les cellules endothéliales seront étudiées grâce à un système de vidéo microscopie intravitale, permettant de filmer l'intérieur d'un vaisseau sanguin. Ces modèles expérimentaux sont classés comme légers. Au terme de ces expériences, nous étudierons la capacité de certaines thérapies à inhiber le phénotype pro-thrombotique des cellules mutées.

Ce projet se déroulera en trois phases : génération des animaux transgéniques (issus de fournisseurs agréés ou de collaborateurs), réalisation de la caractérisation phénotypique de lignées murines puis des procédures expérimentales. Dans la conception de ces études, nous avons été particulièrement attentifs au bien-être des animaux et au respect de la règle des 3R.

Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous avons réalisé une bibliographie grâce à laquelle nous avons pu déterminer le nombre d'animaux minimum par groupe, les tests statistiques à utiliser et les souches de souris les plus pertinentes à utiliser. De plus, à partir d'un seul animal, nous allons générer différents échantillons (organes, cellules sanguines, plasma). Le nombre de souris s'élève à 1597, plus 150 géniteurs et 2035 animaux n'ayant pas le génotype d'intérêt, soit 3782 souris.

De la même façon, afin de limiter la souffrance des animaux, nous allons travailler avec une faible dose de molécule pro-inflammatoire et sur un temps court. Tous les prélèvements sanguins ainsi que les administrations par voie intraveineuse seront réalisés sur des animaux préalablement anesthésiés. Enfin, nous avons établi des points limites suffisamment précoces auxquels nous avons associé des actions à mettre en place dans les plus brefs délais (grille d'Observations/Réactions).

Au terme des cinq années d'études, nous pourrons donc décrypter de façon très complète les interactions entre les cellules sanguines et des cellules endothéliales et leur rôle dans la physiopathologie de la thrombose. Mais également, nous pourrons évaluer l'efficacité des traitements en cours ainsi que celui de nouvelles thérapeutiques.

**9353** La tuberculose pulmonaire humaine, causée par la bactérie intracellulaire *Mycobacterium tuberculosis*, fait encore partie au 21<sup>ème</sup> siècle des dix principales causes de décès dans le monde. En 2015, 1,8 million de décès et 10,4 millions de nouveaux cas d'infection ont été enregistrés par l'Organisation Mondiale de la Santé. La fréquence du succès du traitement de la tuberculose par des antibiotiques est de 83% mais se réduit à seulement 52% dans le cas de la tuberculose multi-résistante dont l'incidence est en hausse (4,6% parmi les nouveaux cas de tuberculose en 2015).

En terme de prévention, le mutant atténué de *Mycobacterium bovis*, Bacille de Calmette et Guérin (BCG), est actuellement le seul vaccin anti-tuberculeux. Administré essentiellement à la naissance pour la prévention dans les zones endémiques, il n'y confère qu'une très faible protection contre la tuberculose pulmonaire d'adulte. La faible efficacité du BCG a été attribuée : (i) au déclin progressif des réponses immunitaires à partir de 10 ans post-vaccination, (ii) à l'induction de faibles réponses contre les antigènes associés à la latence, et (iii) à l'absence d'induction de réponses spécifiques des antigènes de *M. tuberculosis* que le BCG n'exprime pas.

Deux catégories de vaccins anti-tuberculeux sont actuellement en développement : (A) les vaccins vivants atténués, qui auront pour vocation de remplacer le BCG, et (B) les vaccins sous-unitaires, essentiellement en vue d'immunisation de rappel à l'âge adulte. Notre projet vise à approfondir le potentiel vaccinal de nouveaux candidats vaccins anti-tuberculeux appartenant à chacune de ces catégories, et développés par nos laboratoires, contre la pathologie pulmonaire médiée par *M. tuberculosis* dans le modèle préclinique de souris.

Ce projet fera emploi de :

A) Deux nouveaux vaccins vivants atténués :

A1) Une souche de BCG recombinante complémentée par la région chromosomique dite «ESX-1» du pathogène aquatique *Mycobacterium marinum* (BCG : ESX-1Mmar) et qui présente une immunogénicité et une capacité protectrice supérieure au BCG, et

A2) Une souche de *M. tuberculosis* portant une délétion génétique de la région dite «ppe25-pe19» (*Mtb*Δppe25-pe19), ce qui lui confère un phénotype atténué, toute en lui préservant une grande immunogénicité.

B) Des vaccins candidats sous-unitaires constitués d'un vecteur lentiviral portant des séquences codant pour des antigènes qui s'expriment à différents stades de l'infection par *M. tuberculosis*.

Nous évaluerons la capacité protectrice d'une vaccination de type «prime» (primo-immunisation) avec des candidats vaccins vivants atténués, suivi d'une vaccination de type «boost» (immunisation de rappel) par des vecteurs lentiviraux. Des souris non vaccinées ou vaccinées seront ensuite soumises à l'épreuve par une faible dose (1-5 x 10<sup>2</sup> CFU/souris) de *M. tuberculosis* par aérosol afin de mimer l'infection telle qu'elle se produit chez l'homme. L'efficacité vaccinale sera évaluée chez

ces animaux 5 à 10 semaines post infection par des analyses microbiologiques, immunologiques et histopathologiques.

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

En vue de « Raffiner » nos expériences, chez les souris infectées par *M. tuberculosis*, une surveillance sera mise en place à raison 2 fois par semaine à partir d'un mois après le challenge par *M. tuberculosis*. Cette surveillance sera assurée par le concepteur du projet ou les chercheurs contractuels qui travaillent sur ce projet. La surveillance sera également assurée par les techniciens animaliers, en charge de nettoyer les cages et qui sont présents dans l'espace de l'animalerie tous les jours. De plus, des vétérinaires effectueront des visites ponctuelles et hebdomadaires des animaux. La cage des souris comportera, comme élément d'enrichissement, du coton dentaire, pour que les animaux puissent construire un nid.

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

Afin de « Réduire » le nombre d'animaux utilisés, basés sur les tests statistiques, nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus/groupe expérimental qui permette une analyse statistique pertinente et concluante. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 456, inclus dans une deux procédures expérimentales de classe légère.

Aucun modèle *in vitro* ne permet à ce jour d'étudier la pathogenèse à l'infection par *M. tuberculosis* et la vaccination contre cette infection. La stratégie de « Remplacement » consiste ici à utiliser le modèle souris, car cette espèce est relativement résistante à l'infection par *M. tuberculosis*, ce qui minimise la souffrance animale tout en évitant l'utilisation d'animaux de plus grande taille et de plus grande sensibilité, tel que le cobaye.

**9354** L'efficacité de certains anticorps (anti-PD1 et/ou anti-CTLA4) sur le cancer du poumon, du rein ou du mélanome fait actuellement l'objet de nombreuses études cliniques. Ces anticorps monoclonaux permettent une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Cependant, certains patients développent une résistance à ce traitement. Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'activation du système immunitaire anti-tumoral permettant d'améliorer l'effet de thérapies anti-cancéreuses, notamment de l'anti-PD1, de l'anti-CTLA4 et du cyclophosphamide. Chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale qui pourrait être impliqué dans la résistance aux traitements ou dans la modulation de l'efficacité thérapeutique de ces agents.

Par conséquent, notre objectif est d'analyser l'influence de la flore intestinale sur la sensibilité aux immunothérapies. Pour cela, nous collectons les fèces de patients atteints de cancer du poumon/rein/mélanome afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Par ailleurs, nous administrerons des bactéries spécifiques, provenant de selles de volontaires sains ou des cellules immunitaires préalablement activées par des bactéries ayant été démontré (dans notre laboratoire) comme activant la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisant l'effet de thérapies anti-cancéreuses. Après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec les anticorps thérapeutiques (anti-PD1 et/ou l'anti-CTLA4). Ces manipulations vont nous permettre de : 1- caractériser la composition en bactéries de la flore intestinale des patients, en étudiant les conséquences sur la progression tumorale, l'efficacité anti-tumorale du traitement anti-PD1 et/ou anti-CTLA4 ainsi que sur l'activation du système immunitaire; 2- sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une supplémentation en bactéries impliquées dans l'amélioration de la réponse au traitement anti-PD1 et/ou anti-CTLA4; 3- identifier des bactéries/selles immuno-modulatrices capables de rétablir ou d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'anti-PD1 et/ou l'anti-CTLA4 chez des patients dysbiotiques (ayant une flore intestinale dysfonctionnelle).

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 7614 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, le nombre de lignées tumorales, le nombre de prélèvements fécaux et l'étendue de la diversité de la flore intestinale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront aussi les exigences de réduction et raffinement. En effet, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie pour toutes les procédures, en assurant un suivi clinique étroit et en suivant la croissance tumorale par imagerie.

**9355** Clostridium difficile est une bactérie première cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, 14 % de formes compliquées dont la plus connue est la colite pseudomembraneuse, marquée par 3 % de mortalité). La contamination a lieu à partir des spores, forme de résistance et hautement contagieuse de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à C. difficile peuvent évoluer sur un mode épidémique (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à C. difficile sont fréquentes (environ 20 %) et des résistances aux antibiotiques apparaissent. Les microARNs (miRNAs) sont de plus en plus décrits comme régulateur de la réponse immunitaire notamment de la réponse inflammatoire lors d'une infection bactérienne. Nous souhaitons évaluer la possibilité d'utiliser ces miRNAs comme outil thérapeutique permettant de contrôler cette réponse inflammatoire. En effet elle peut être néfaste pour l'organisme si elle est trop exacerbée et contribue à la formation de la colite pseudomembraneuse lors des infections à C. difficile.

L'objectif de ce projet est d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité in vivo de trois miRNAs dans un modèle de souris infectées par la bactérie, préalable indispensable à la poursuite d'autres étapes de développement clinique de ces molécules. Les animaux infectés par la bactérie seront traités ou pas avec les différents miRNAs et il sera évalué la capacité de ces miRNAs à réduire la réponse inflammatoire au niveau du caecum, lieu principale de l'infection.

L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée :

Remplacement : plusieurs tests in vitro sur un modèle de cellules de l'intestin ont permis de démontrer au préalable que les trois miRNAs présentaient une activité anti inflammatoire intéressante. L'étape de vérification de son activité in vivo est exigible réglementairement avant toute nouvelle phase de développement clinique. Le recours à l'animal est indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider de nouvelles cibles thérapeutiques car il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro ou in silico capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction : une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les groupes contrôles des animaux ont été mutualisés aussi souvent que possible. Au total, un nombre maximal de 36 souris sera nécessaire pour la procédure de cette étude.

Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. La procédure sera pratiquée si nécessaire en utilisant des anesthésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

Les résultats de cette étude permettront d'envisager de nouvelles méthodes de contrôle de l'infection à *Clostridium difficile*.

**9356** Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la toxicologie et de l'efficacité thérapeutique. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament.

Ce projet a pour but d'étudier l'effet de traitements dans des modèles de cachexie induite par un anti-cancéreux chez la souris. Pour nos études, nous utiliserons deux modèles de cachexie (un modèle aigu et un chronique). Le développement de molécules pour prévenir des effets secondaires (perte de poids, perte d'appétit, perte de masse musculaire etc) associés à la cachexie cancéreuse est particulièrement important pour le confort des patients traités par chimiothérapie.

Nos études permettront d'évaluer l'action de traitements ou de combinaisons de traitements sur la cachexie induite par la chimiothérapie. Pour ce projet nous pensons effectuer 30 études avec pour chaque étude, l'utilisation de 50 souris (5 groupes de 10 animaux par groupe), soit 1500 animaux sur 5 ans (voir tableau récapitulatif). Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 3 combinaisons de molécules par an dans le modèle aigu et le modèle chronique.

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

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

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

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

Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée (au moins une fois par jour) afin de détecter les points limites associés à l'induction de la cachexie. Les souris seront suivies quotidiennement pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement de la souris (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, l'état du pelage, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle expérimental nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

**9357** Dans un souci de préservation de la biodiversité, notre laboratoire travaille depuis plusieurs années sur l'amélioration de la qualité de semence de boudet aussi bien in vitro qu'in vivo. Ainsi, dans le but d'améliorer la fertilité de la semence de boudet congelée, nous souhaitons savoir si l'acte d'insémination pourrait avoir une incidence sur cette dernière ou si, les cryoprotecteurs contenus dans les milieux de congélation, pourraient avoir un effet néfaste sur le tractus génital femelle.

De ce fait, nous souhaitons doser les prostaglandines (PGF2a) qui interviennent dans le processus de clairance utérine (élimination de substances via l'urine) et nous souhaitons également étudier l'effet potentiel du cortisol et de l'ocytocine, hormones du stress, sur la fertilité. Le but étant donc de doser ces trois hormones afin de mieux cerner leurs effets.

Egalement, nous avons pu constater, à travers une autre étude menée au sein de notre laboratoire et en partenariat avec une entreprise privée, que le tractus génital femelle de l'ânesse possédait certaines particularités (anatomie, physiologie...). Ainsi, nous pourrions mieux appréhender la technique d'insémination dans cette espèce et mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui entrent en jeu lors de cet acte, car peu de bibliographie traitent de ce sujet.

Ce programme de recherche suit la règle des 3R.

Réduction : Les 9 ânesses de l'élevage expérimental seront utilisées, l'effectif que nous estimons minimum pour l'obtention de résultats statistiques interprétables. La montée des taux d'hormones sera comparée à l'intérieur de chacun des lots et entre les lots.

Raffinement : Afin de réduire au maximum l'invasion des prises de sang, celles-ci seront réalisées à l'aide d'aiguilles et non à l'aide de cathéters. Aussi, lors de ces dernières, les animaux seront entraînés à coopérer via la méthode du renforcement positif. Tout cela de façon à diminuer le stress et la contention des animaux. Aussi, les ânesses sont amenées quotidiennement dans les barres d'échographies pour les suivis folliculaires et sont donc habituées à ce type de contention. Le reste du temps, elles vivent au pré, sont nourries avec de l'herbe et du foin et vivent en troupeau.

Remplacement : Recherchant une réponse globale mettant en jeu des phénomènes hormonaux et reproducteurs, et donc impliquant différents organes, il est aujourd'hui impossible d'effectuer ce type d'étude in vitro. Seules les études in vivo peuvent être envisagées.

**9358** De par leurs effets sur la destinée cellulaire, les stéroïdes sexuels sont des hormones pléiotropes connues pour exercer des effets puissants sur le développement et le fonctionnement du système nerveux central selon des mécanismes extrêmement complexes et mal connus. Des avancées récentes ont conduit à impliquer les stéroïdes sexuels dans les mécanismes de neurogénèse réparatrice. Les dommages cérébraux générés lors d'accidents vasculaires cérébraux ou de lésions cérébrales traumatiques induisent une rupture de l'intégrité de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE, une barrière physiologique entre le sang et le cerveau). La perturbation de l'homéostasie de cette barrière peut aboutir à une augmentation du stress oxydant au niveau cérébral, de la neuro-inflammation et entraîner une mort neuronale progressive. Les stéroïdes, notamment les œstrogènes, sont connus pour leurs propriétés neuro-protectrices. Une action neuro-protectrice des œstrogènes a été mise en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux de neuro-toxicité établis in vitro (Remplacement). Cependant les études in vivo, limitées à ce jour, restent indispensables puisque seules les études à l'échelle de l'organisme entier peuvent nous apporter des réponses précises quant à l'effet neuro-protecteur des œstrogènes dans des situations de réparation cérébrale. De plus, il est indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les mécanismes de réparation cérébrale qui doivent tenir compte de la complexité cellulaire et tissulaire du cerveau. Le poisson zèbre présente plus de 70% de gènes en commun avec l'homme et 85% de gènes impliqués dans des pathologies sont communs entre l'Homme et le Poisson. C'est un modèle utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques.

Dans ce contexte, nous nous proposons d'étudier l'impact des œstrogènes sur l'expression de gènes impliqués dans la BHE dans deux conditions : en condition physiologique normale et à la suite de lésion cérébrale. Le modèle animal utilisé sera le poisson zèbre adulte, ce modèle animal étant reconnu par la communauté scientifique.

Seules des techniques utilisant l'animal vivant peuvent nous permettre de répondre à nos questions puisque l'intérêt porte sur l'effet potentiellement bénéfique d'une hormone sur les mécanismes de réparations cérébrales impliquant notamment la BHE. Ces analyses ne peuvent être réalisées en culture cellulaire et le modèle « poisson zèbre » constitue à l'heure actuelle une bonne alternative pour développer ce projet. Les animaux sont élevés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. Le nombre d'animaux sera réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable (Réduction). Il est toutefois nécessaire d'avoir une quantité suffisante d'animaux pour pouvoir extraire le matériel génétique de la zone lésée qui est très restreinte. Trois répétitions indépendantes seront reproduites portant ainsi le nombre de poisson zèbre utilisés à 480. Afin d'améliorer les conditions de vie des poissons zèbres (Raffinement), un suivi strict des animaux sera instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort et la douleur lié à l'expérimentation et la détresse qu'ils pourraient éprouver. Pour cela des soins pré et post-opératoires adéquats seront apportés. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans différents aquariums au sein d'une même salle et bénéficieront ainsi d'un enrichissement adapté. Ce travail nous permettra de définir l'impact des

œstrogènes, sur la neuro-plasticité et en particulier sur le maintien/le rétablissement de l'intégrité de la BHE en condition physiologique et dans des conditions de lésions.

**9359** Les récepteurs 1A de la sérotonine (aussi appelés récepteurs 5-HT1A) participent à la mise en place de nombreuses fonctions cérébrales et sont impliqués dans diverses maladies psychiatriques et neurodégénératives. Utiliser des médicaments ciblant ces récepteurs pourrait notamment constituer un nouveau traitement dans la maladie de Parkinson. En effet, plusieurs études ont montré que la stimulation des récepteurs 5-HT1A permet une amélioration des symptômes moteurs dans les modèles animaux de cette pathologie. De plus, le principal traitement de la maladie, la L-DOPA (un médicament permettant de compenser le déficit de dopamine observé chez les patients) provoque à long terme l'apparition de mouvements anormaux et involontaires, les dyskinésies, chez 30 à 80% des patients. De nombreux arguments suggèrent que ces dyskinésies sont provoquées par une mauvaise utilisation de la L-DOPA par certains neurones. La stimulation des récepteurs 5-HT1A présents sur ces neurones permet de bloquer de manière efficace les dyskinésies. Le NLX-112 (aussi appelé F13640 ou befiradol), une molécule ciblant et activant spécifiquement ces récepteurs, a montré des effets particulièrement prometteurs dans cette indication au cours des premières études précliniques. En revanche, le mécanisme d'action de cette molécule est encore mal compris, dû à la grande diversité de neurones exprimant les récepteurs 5-HT1A, et au manque d'information sur la quantité de récepteurs présents chez les parkinsoniens. Le projet vise donc à répondre à plusieurs questions cruciales pour le développement du NLX-112 comme futur médicament :

- La dégénérescence des neurones à dopamine survenant dans la maladie de Parkinson s'accompagne-t-elle de modifications de la densité et du fonctionnement des récepteurs 5-HT1A ?
- Quels sont les mécanismes contribuant à l'effet thérapeutique du NLX-112 ?
- Quelle est la proportion de récepteurs 5-HT1A ciblée par le NLX-112 à dose thérapeutique ?
- Quelle est la cinétique du NLX-112 dans le cerveau à dose thérapeutique ?

Pour ce faire, nous utiliserons le modèle du rat hémiparkinsonien, sur lequel les effets thérapeutiques du NLX-112 ont déjà été démontrés. Ce modèle présentant une lésion des neurones à dopamine dans un des deux hémisphères du cerveau est le modèle le plus utilisé pour la maladie de Parkinson : il est reproductible, facile à obtenir, et les animaux supportent bien la lésion par rapport à d'autres modèles. En effet, contrairement à des lésions bilatérales, les effets attendus d'une lésion unilatérale sont discrets (principalement des déficits de motricité mis en évidence lors de tests comportementaux) et on n'attend pas de perte de poids particulière ni de signe de souffrance. Ce modèle est nécessaire compte tenu du fait que le NLX-112 n'est pas encore autorisé en phase clinique (pas de remplacement possible). Pour répondre à l'ensemble de ces questions, ce projet de recherche fondamentale, d'une durée de 5 ans, nous utiliserons des techniques d'imagerie comme l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et la tomographie par émission de positons, permettant de réduire l'inconfort des animaux puisque ces techniques sont non invasives et transposables à l'humain (respectant la règle de raffinement des 3Rs) et d'effectuer plusieurs examens par animal (permettant de réduire le nombre total d'animaux nécessaire). Un total de 70 rats permettra de répondre à l'ensemble des questions expérimentales du projet avec une puissance statistique suffisante pour les observations attendues.

**9360** Le système nerveux central (SNC), et en particulier le cerveau, est sujet au développement de pathologies graves comme les tumeurs malignes, les maladies neurodégénératives ou les accidents vasculaires cérébraux. Le système nerveux central étant le pilote des fonctions vitales (motricité, cognition, fonctions végétatives...), les conséquences physiopathologiques de ces atteintes ou les séquelles suite à un traitement peuvent entraîner des lésions et déficiences aux conséquences mortelles ou très invalidantes. L'efficacité de la prise en charge de ces pathologies repose sur un diagnostic précoce et sur des traitements efficaces et protecteurs pour le tissu nerveux. L'anatomie, la complexité et la sensibilité du SNC rendent difficile le développement de traitements efficaces. Les dispositifs médicaux et les techniques chirurgicales innovantes constituent des pistes très prometteuses pour améliorer le diagnostic et le traitement des pathologies du cerveau.

L'utilisation in fine chez les patients sont des procédures à haut risque et il est donc indispensable d'avoir recours à l'expérimentation animale au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement des

méthodes/ dispositifs et leur durabilité. Cela doit impérativement se faire sur des organes animaux de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions fonctionnelles qui reproduisent la fonction de l'organe vivant (sécurité locale = organe cible) et de vérifier les potentiels effets secondaires sur l'ensemble de l'organisme (sécurité générale = ensemble de l'organisme). L'expérimentation sur l'organisme entier, et donc sur animal vivant est donc incontournable. Le cerveau est un organe complexe et intégré, pour lequel il n'existe à ce jour aucun modèle in vitro ou numérique adapté pour les besoins scientifiques du projet.

Le projet de recherche vise à développer des dispositifs médicaux et techniques chirurgicales innovantes, permettant de mieux traiter ou diagnostiquer les pathologies du système nerveux central et en particulier du cerveau. L'implantation du dispositif chez l'animal permet de respecter les contraintes anatomiques trouvées chez l'homme et ainsi de valider dans ces conditions la tenue et le fonctionnement du dispositif.

Le projet prévoit le recours à des modèles porcins justifiés par une taille et une fonction cérébrales proche de ceux de l'Homme, avec au maximum 200 animaux pour la durée totale du projet. Le nombre d'animaux a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Les procédures expérimentales sont classées modérées à sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupe et ont accès à un enrichissement environnemental multimodal (social, alimentaire, manipulation, physique).

Durant les interventions sous anesthésie, les paramètres vitaux sont enregistrés et contrôlés par des techniciens spécialisés en anesthésie afin d'adapter les perfusions, l'assistance respiratoire et les dosages d'anesthésiques et d'antalgiques. Les protocoles de réanimation sont standardisés et réalisés par des vétérinaires chirurgiens spécialisés.

**9361** Le but de ce projet est de développer un traitement pour la dysplasie spondylo-épiphysaire congénitale (SEDC), une collagénopathie de type 2. La SEDC est une dysplasie osseuse génétique qui cause une forme rare de nanisme chez l'être humain. Elle est caractérisée par une petite taille avec un raccourcissement du tronc et du cou, induisant un risque important d'instabilité aux niveaux des vertèbres cervicales pouvant induire une paralysie. Les patients souffrent également d'anomalies au niveau des yeux et une perte d'audition. Cette pathologie est due à des mutations perte de fonction dans le gène du collagène de type 2.

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons un modèle de souris atteinte de SEDC. Il s'agit d'un mutant spontané dont le phénotype est similaire à la pathologie humaine avec des atteintes du squelette, des anomalies rétinienne et un développement anormal de l'oreille interne.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme sur plusieurs niveaux. D'une part, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour les collagénopathies de type 2 permettant de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications dues à cette pathologie. D'autre part, cette pathologie étant encore peu connue ce projet nous permettra de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie.

Afin de satisfaire aux exigences de remplacement, nous avons réalisé un screening in vitro des approches thérapeutiques à tester afin de ne tester in vivo que les stratégies présentant un potentiel thérapeutique élevé. De manière à répondre aux exigences de réduction nous allons utiliser des groupes contrôles en commun quand cela est possible et utiliser les données obtenues en procédure 2 comme données contrôles en procédure 3. Dans le but de répondre aux exigences de raffinement, nous avons établi des points limites adaptés aux animaux que nous utilisons et aux expérimentations que nous pratiquons. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 2250 souris soit 280 souris dans la procédure 1, 770 souris dans la procédure 2, 1200 souris dans la procédure 3.

**9362** Le rétrécissement aortique (RA) chez l'adulte est la valvulopathie la plus répandue dans les pays développés. Sa fréquence a augmenté dans les dernières décennies due au vieillissement général



de la population. Cette pathologie est caractérisée par une diminution du diamètre de la valve aortique provoquant ainsi une gêne à l'expulsion du sang en dehors du cœur vers l'aorte. Le seul traitement qui permet actuellement d'éviter une évolution fatale consiste à remplacer la valve aortique par voie chirurgicale ou percutanée. Comprendre les mécanismes d'évolution de la maladie est un enjeu majeur pour envisager à terme un traitement médical qui ralentirait l'évolution du RA et éviterait le recours au remplacement valvulaire.

Dans une perspective de développements futurs d'outils diagnostiques et thérapeutiques, seule l'utilisation de modèles animaux nous rapproche des conditions physiopathologiques humaines. A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vivo* fiable de rétrécissement aortique. On sait cependant de longue date que les patients ayant eu une radiothérapie du thorax sont plus à risque de développer un RA. De plus, il a été décrit récemment que l'irradiation de cellules de valve en culture entraîne le processus de calcification en cause dans le RA, jetant les bases pour le développement d'un modèle *in vivo*. Ce projet vise à mettre en place un modèle *in vivo* fiable de rétrécissement aortique dont le but à terme sera de permettre l'évaluation de nouvelles techniques diagnostiques ou de traitements médicaux.

Ce projet propose l'ensemble des procédures permettant d'induire des calcifications de la valve aortique par radiothérapie ainsi que la caractérisation des conséquences fonctionnelles de ces lésions. Dans ce cadre, le remplacement de l'utilisation des animaux est impossible. Afin de sensibiliser l'activation de l'inflammation et des mécanismes de calcification, nous utiliserons une souche de souris transgénique ApoE<sup>-/-</sup> qui présente une athérosclérose précoce. Les données obtenues chez ces animaux seront comparées à celles obtenues chez des animaux contrôles C57Bl6.

Dans un souci de réduction du nombre de procédures sur les animaux, et du nombre final d'animaux, nous proposons d'effectuer une série d'imagerie IRM sur un groupe restreint d'animaux de taille et d'âge similaires à ceux qui seront utilisés durant cette étude. Ceci permettra de développer un atlas anatomique pour la localisation de la valve aortique qui servira par la suite pour l'ensemble des procédures d'irradiation sans nécessiter d'animaux supplémentaires. Les animaux utilisés pour développer cet atlas seront inclus par la suite dans le projet afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

L'ensemble du projet inclura 116 animaux. Premièrement, au maximum 20 animaux C57Bl6 seront utilisés pour la réalisation de l'atlas anatomique puis ces animaux serviront pour les expérimentations de mise en place et de calibration des différentes procédures. Ensuite 8 lots d'animaux seront formés, 4 par lignées d'animaux (C57Bl6 et ApoE<sup>-/-</sup>), chaque lot étant constitué de 12 animaux. Différentes irradiations seront évaluées, et les animaux seront suivis (i) par échographie pour évaluer les conséquences de l'irradiation sur le myocarde et (ii) par IRM pour évaluer l'inflammation. Enfin, à la fin du projet, les animaux auront une mesure des pressions intracardiaques et seront euthanasiés afin d'effectuer une analyse histologique de la valve.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV) avec une pression de 20-25Pa avec un renouvellement de 25 fois le volume d'air de la pièce toutes les heures et une température de 21±1°C. L'exposition à la lumière sera de 6h45 à 18h45. La nourriture, la boisson et la litière seront changées une fois par semaine. La litière de peuplier "aspen small", plus douce et variée pour les animaux permet de réduire le niveau de stress. Cette litière est plus chère mais possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid. A la suite des procédures, un suivi régulier est effectué pendant 5 jours par du personnel formé et expérimenté.

Pour l'ensemble des procédures, l'anesthésie est réalisée par l'inhalation d'un mélange gazeux O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O 1 : 2 avec de l'isoflurane à 5% pendant 3 minutes puis un maintien de l'anesthésie avec le même mélange avec de l'isoflurane à 2%. La qualité de l'anesthésie est évaluée par stimulation du réflexe podal. Si après pincement de la patte de l'animal, le réflexe podal est toujours présent, l'anesthésie à 5% est prolongée jusqu'à la perte du réflexe. Lors des procédures d'imagerie, le suivi de la fonction respiratoire est toujours effectué, celui-ci permet d'évaluer la qualité de l'anesthésie et également de faire le suivi physiologique de l'animal. Si l'un de ces deux facteurs se dégrade, la

procédure est arrêtée prématurément. De plus, lors des procédures d'IRM, le suivi de la fonction cardiaque par électrocardiogramme permet d'avoir un autre paramètre pour évaluer les conditions physiologiques de l'animal. Comme précédemment, une diminution de la fonction cardiaque trop importante entraîne l'arrêt prématuré de la procédure. La gestion de la douleur est réalisée par injection intrapéritonéale de buprénorphine à 0.05mg/kg.

**9363** Parmi les tissus des organismes vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules sont mises en place au cours du développement. Le développement et la maintenance de ces cellules sont cruciaux à l'homéostasie et à la régénération musculaire. Nous souhaitons étudier le rôle des protéines Hira et Daxx qui sont impliquées dans l'organisation structurel de l'ADN. Le maintien de cette structure est déterminant pour les fonctions cellulaires. Notre projet consiste à étudier le rôle de Hira et Daxx pendant la formation et régénération du muscle squelettique.

Nos projets s'intéressent à des processus biologiques qui reposent sur l'évolution au cours du temps et/ou l'interaction entre de nombreux types cellulaires/tissus. De fait, l'étude de ces processus au sein d'un organisme dans son ensemble où toutes les cellules impliquées sont en étroite communication est nécessaire et ne peut être substituée qu'en partie par l'in vitro. En accord avec le principe des 3R afin de réduire et remplacer l'utilisation excessive d'animaux impliqués dans les expériences in vivo, nous avons établi des lignées cellulaires myogéniques mutantes pour Hira et Daxx. Nous avons caractérisé et étudié ces lignées pour cibler les expériences les plus pertinentes à développer chez la souris pour la validation in vivo. Les deux procédures principales visent à analyser et caractériser les fonctions d'Hira et Daxx au cours du développement et de la régénération musculaire. Pour essayer de minimiser la souffrance et le stress induits aux animaux, des analgésiques seront administrés avant et après la procédure d'induction de la régénération musculaire. De plus, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages les 3 premiers jours pour faciliter l'alimentation des animaux qui peuvent présenter une mobilité réduite pendant cette période. Notre étude fera appel à un total de 1614 souris réparties sur 4 procédures expérimentales.

**9364** Actuellement, les dosages d'hormones de la reproduction sur l'espèce bovine au sein du laboratoire ont lieu sur des prélèvements sanguins. Le but est de développer le dosage de ces hormones sur des prélèvements de lait et de salive. L'intérêt de ces prélèvements serait d'éviter des interventions invasives et potentiellement douloureuses chez l'animal. Nous souhaitons mettre au point des mesures quantitatives et fiables sur ces différents liquides biologiques et de vérifier la corrélation entre les concentrations obtenues dans le lait et la salive, et celle issue du plasma sanguin. Des prélèvements de ces trois substrats seront faits sur 6 vaches au cours d'un cycle sexuel sur une période de 24 jours. La méthode de dosage se focalisera sur la progestérone, bon indicateur de la cyclicité sexuelle.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : pour développer le dosage d'hormones sur différents liquides biologiques chez l'espèce bovine, aucune autre méthode de substitution ne peut être utilisée.

Réduction : six vaches sont requises pour étudier la corrélation entre les concentrations obtenues sur différents liquides biologiques. C'est le nombre minimum requis pour une conclusion satisfaisante.

Raffinement : les vaches utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (vie en troupeau, surface paillée, nourriture et eau en permanence). Ces animaux seront dans leur condition d'élevage habituelle avec leurs congénères (troupeau d'environ 60 vaches). Des brosses à vache sont à disposition dans la stabulation. Elles sont habituées à la présence des animaliers et faciles à manipuler. Au cours des prises de sang les animaliers appliqueront de la pommade Vétébiol sur le sillon jugulaire pour son action apaisante et décongestionnante.

**9365** Lors d'une intervention chirurgicale, des hémorragies non contrôlées peuvent avoir lieu. Ces hémorragies sont responsables de la moitié des décès per- et post-opératoires. Les chirurgiens utilisent alors des agents hémostatiques (qui arrêtent le saignement), mais ces produits peuvent causer des effets secondaires en raison de leur mauvaise élimination lorsqu'ils sont laissés trop longtemps en place. À ce jour, aucune étude n'est disponible pour analyser et comparer de manière exhaustive les effets de ces agents hémostatiques sur l'arrêt du saignement et la fonction des plaquettes sanguines qui sont des cellules du sang jouant un rôle essentiel pour arrêter le saignement en cas de lésion des vaisseaux sanguins.

Le but de notre étude est de comparer et de comprendre les effets *in vivo* de deux nouveaux pansements hémostatiques sur la fonction plaquettaire et l'arrêt du saignement en cas d'hémorragie. En effet, ces deux nouveaux pansements hémostatiques sont non résorbables, contrairement à ceux actuellement utilisés en chirurgie, ce qui serait un atout majeur dans le cadre hospitalier puisqu'il permettrait un meilleur arrêt des saignements tout en réduisant les effets secondaires dus à une mauvaise résorption des hémostatiques actuellement sur le marché.

Des études *in vitro* ont déjà eu lieu et elles ont montré le potentiel hémostatique de ces deux nouveaux pansements et leur action sur les plaquettes sanguines. A présent, il est essentiel de validation l'efficacité de ces pansements *in vivo* dans un modèle animal avant de pouvoir les proposer en clinique pour le traitement des hémorragies majeures. En effet, une étude chez l'animal (ici la souris) est nécessaire pour évaluer l'effet de ces pansements hémostatiques sur les interactions entre le vaisseau sanguin, les cellules du sang, le flux sanguin et les facteurs de la coagulation. Ces interactions très complexes ne peuvent pas être reproduites à l'heure actuelle *in vitro* du fait de leur complexité et de la multitude de partenaires.

En résumé, ce projet permettra de valider *in vivo* si ces deux nouveaux pansements hémostatiques sont plus efficaces par rapport à ceux déjà utilisés en clinique avant d'envisager une utilisation en chirurgie humaine.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant le bien-être des animaux avec un enrichissement du milieu (morceaux de bois à ronger, filaments de papier kraft pour faire un nid), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Par ailleurs, pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statiquement analysable. Ainsi le nombre total de souris prévu est de 225.

**9366** Les cellules lymphoïdes innées se développent dans la moelle osseuse puis migrent vers les organes périphériques. La circulation des lymphocytes dépend de nombreux facteurs, dont l'expression de récepteurs à cytokines. Le mode de circulation (sanguine et/ou lymphatique) de ces cellules n'est pas bien connu. Le but de cette procédure expérimentale est de comprendre les mécanismes permettant cette circulation et l'identification des voies moléculaires impliquées. L'étude de la circulation des lymphocytes ne peut pas se faire sur des modèles *in vitro* et nécessite pour sa compréhension l'utilisation de souris transgéniques pour des récepteurs à cytokines. Nous utiliserons un total de 216 souris mâles et femelles sous fond C57BL6, âgés de 8 à 10 semaines et comprenant 10 lignées modifiées (avec 2 haplotypes différents) pour la non-expression de cytokines/récepteurs à cytokines. Nous avons comptabilisé 216 animaux comme le nombre minimal de souris nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement reproductibles (par comparaison des souris sauvages C57BL6 « contrôles » avec celles de 10 lignées modifiées différentes). Les souris seront profondément anesthésiées avant toute manipulation puis directement euthanasiées avant leur réveil. Ainsi, la souffrance animale est estimée comme minimale et concerne une classe sans réveil. Aucun dommage n'est attendu. Le seul point limite à surveiller pour ce projet est la qualité de l'anesthésie tout au long de la procédure, ainsi nous avons choisi l'anesthésie gazeuse qui est stable et profonde.

**9367** La sclérose en plaque (MS) touche plus de 2.3 millions de personnes dans le monde avec des atteintes neurologiques invalidantes. Différentes formes cliniques existent selon la progression de l'aggravation des attaques de ces fonctions neurologiques. Il s'agit de pathologies auto-immunes

conduisant à des attaques des constituants de Système Nerveux central (CNS). La forme la plus courante est la forme RR-MS ou 'Relapsing Remitting' où les patients sont touchés par des poussées, espacées par des périodes de rémission. Pour cette forme, il existe de nombreux modèles in vivo dont le modèle d'Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE) induite chez la souris SJL par immunisation avec une protéine exprimée au niveau du CNS, la PLP (Proteolipid Protein). Dans ce modèle de rémission/rechute, les souris développent des signes d'atteintes neurologiques conduisant à une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs avec un pic entre J14 et J16 suivi de rémission et d'un nouveau pic entre J25 et J30.

Les patients atteints de MS ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des poussées. Nous souhaitons évaluer l'approche de thérapies cellulaires autologues utilisant les propres cellules T régulatrices du système immunitaire du patient (isolées puis épanchées à partir du sang). Elles seront isolées et modifiées par génie génétique pour induire l'expression d'une molécule chimérique (CAR-Treg) permettant un ciblage local de leur activité immunorégulatrice.

Le rôle des cellules T régulatrices (Treg) du système immunitaire a largement été démontré dans des nombreuses pathologies auto-immunes. Chez les patients atteints de MS, une réduction du nombre ou de la fonction des Treg ont été décrites. L'approche d'une thérapie cellulaire basée sur la génération des cellules CAR-Treg est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle approche pour les patients réfractaires aux traitements actuels. Afin de pouvoir développer cette approche thérapeutique chez les patients atteints de MS, il convient de démontrer son efficacité et sa sécurité chez l'animal. Ces données non-cliniques seront la base pour constituer les dossiers réglementaires de soumission d'essai clinique. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères et de mettre en place des points limites adaptés. Ainsi, nous anticipons un nombre de 1857 souris pour l'utilisation du modèle murin d'EAE. La prise en charge de la douleur ne peut être faite que par le raffinement des conditions d'hébergement, d'expérimentation et de suivi. Les animaux seront observés quotidiennement afin de déceler le plus tôt possible tout signe d'inconfort, nous prendront en compte le comportement des souris, la posture et le pelage. Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Les cellules CAR-Treg à tester seront au préalable caractérisées et sélectionnées in vitro. Ce projet comprend à la fois la génération des données d'efficacité, de pharmacocinétique et des données préliminaires de toxicité et de potentiel co-médications avec les médicaments généralement utilisés chez les patients dans des essais cliniques de Phase I à la phase II voire III.

**9368** Raison du projet : étude réglementaire conduite selon la Pharmacopée Européenne, monographie 0447 : étude d'immunogénicité des vaccins inactivés contre la leptospirose canine.

Objectif du projet : étudier l'efficacité et la sécurité dans l'espèce cible de différentes formulations de vaccins tétravalents inactivés contre la leptospirose canine. La leptospirose est une maladie mortelle chez le chien et transmissible à l'Homme.

Différents essais sont prévus afin d'optimiser le seul vaccin tétravalent actuellement disponible en déterminant les formulations qui protègent le mieux les animaux contre l'infection et qui sont le mieux tolérées (celles qui n'entraînent qu'une hyperthermie modérée et de courte durée et une réaction locale minimale).

Dans chaque essai l'une des formulations est la référence (contrôle positif), un lot d'animaux est utilisé comme contrôle négatif et ne reçoit pas de vaccin, et une ou plusieurs formulations nouvelles sont comparées aux deux contrôles.

Il n'y a pas d'alternative pour étudier l'efficacité vaccinale. L'innocuité des formulations est étudiée dans ce même projet.

Le vaccin est administré à la dose de 1 ml chez des chiots non vaccinés de 6 semaines et une seconde vaccination est faite à l'âge de 10 semaines. Les éventuelles réactions locales ou générales sont observées pendant 14 jours après la première vaccination et pendant 7 jours après la seconde. Un prélèvement de sang est fait avant chacune des vaccinations pour un dosage d'anticorps anti leptospires.

Bénéfice attendu : la mise à disposition d'un vaccin contre la leptospirose canine plus efficace et mieux toléré que celui qui est actuellement sur le marché.

Les dommages attendus sont modérés : les chiots vaccinés recevront une dose vaccinale deux fois par voie sous-cutanée et tous les chiots auront deux prélèvements de sang à a veine jugulaire de manière à obtenir 1 ml de serum.

Respect de la règle des 3 R : les chiots sont nés sur le site des essais et sont sevrés à l'âge habituel, ils restent donc dans leur environnement standard. Ils sont hébergés constamment en groupes : avec leur mères et la portée jusqu'à l'âge de 9 semaines puis par lots de vaccins. L'environnement est adapté à leur besoins (température, aliment, jouets, panier en plastique pour le repos, plateforme surélevée.). Ils sont suivis par une équipe dédiée aux maternités et donc spécialisée dans les soins aux mères et aux chiots. Ils sont examinés chaque jour de manière à pouvoir détecter rapidement tout problème de santé ou de bien être liés ou non aux procédures. Un maximum de 56 chiots sera utilisé pour l'ensemble de ce projet.

**9369** L'aspergillose pulmonaire invasive, qui est générée par le champignon *Aspergillus fumigatus*, constitue une entité clinique rare en médecine humaine d'environ 500-1000 cas par an en France, mais grevée d'une mortalité élevée aux alentours de 30-50 %, de par le manque de moyens diagnostiques (qui manquent de spécificité et de sensibilité) et thérapeutiques (seules quelques drogues sont actuellement disponibles, et beaucoup génèrent des effets indésirables qui les rendent difficiles à utiliser).

Actuellement, il n'existe pas de modèles d'aspergillose in vitro qui soient pertinents. Le développement de modèles animaux constitue donc une alternative crédible dans le processus de mise au point de nouveaux outils diagnostiques et pour tester des nouvelles molécules antifongiques. Dans notre établissement, un modèle d'aspergillose pulmonaire invasive a été mis au point chez le rat mâle. Ce support nous permet de mimer avec reproductibilité la maladie humaine, et a été validé par plusieurs publications scientifiques. Dans le passé, nous avons ainsi pu étudier la réponse inflammatoire anti-*Aspergillus*, mieux comprendre la virulence de diverses souches fongiques, et tester l'efficacité de nouvelles thérapeutiques.

Nous souhaiterions dorénavant poursuivre nos investigations expérimentales dans le modèle rat afin :  
1/ d'approfondir la connaissance sur la physiopathologie de l'aspergillose et mieux comprendre les cascades biochimiques impliquées et le recrutement immunitaire, en utilisant des techniques modernes d'immunophénotypage, de spectrométrie de masse, de dosage ex vivo. (approche physiopathologique) ;

2/ de tester des nouvelles drogues anti-*Aspergillus*, en particulier des biomédicaments, en mesurant la charge fongique par des techniques diagnostiques validées en clinique telles que la mesure de l'antigène galactomannane et la détermination de la quantité d'ADN par PCR quantitative (approche thérapeutique).

Pour pouvoir mener des essais qui soient statistiquement représentatifs, le nombre de 30 animaux par protocole a été retenu, ce qui nous permet d'envisager un nombre total de 540 rats.

Afin de respecter la Règle des 3R :

Raffiner : les rats seront élevés en binôme dans des cages enrichies avec du papier et des fragments de tuyaux plastiques. La grande majorité des procédures sera réalisée dans le souci de limiter la souffrance des animaux (anesthésie, usage d'antalgiques et d'antibiotiques...).

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse physiopathologique, d'un organisme entier, suite à une infection pulmonaire. De plus, ils ne permettent pas d'apprécier la mesure de la charge fongique en réponse à quelconque traitement antifongique. A ce jour, les éléments de preuve sont encore insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Le modèle murin d'infection pulmonaire à *A. fumigatus* que nous proposons aujourd'hui est bien établi, permettant de mimer au mieux les phénomènes observés chez l'Homme, et a été publié plusieurs fois par le passé.

Réduire : le modèle d'infection à *A. fumigatus* est maîtrisé par l'équipe, ce qui permet de réduire à zéro les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter le nombre d'animaux.

Au final, il n'y pas de changement à envisager concernant le modèle, et les pratiques expérimentales qui l'entourent, par rapport à celui qui avait validé précédemment en 2014.

**9370** L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente, touchant un million de personnes en France et dont la fréquence d'apparition a doublé en 10 ans. Elle correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Un dysfonctionnement du myocarde, organe hautement oxydatif, entraîne des conséquences dramatiques telles que des troubles métaboliques incluant la production, le transport et l'utilisation de l'énergie, qui affectent non seulement le myocarde mais également les tissus périphériques et notamment les fonctions musculaires. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque. Ce projet vise à caractériser l'impact de voies de biosynthèse de composés intracellulaire impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique cardiaque et la potentialité thérapeutique d'une modulation de celles-ci dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas). De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe éthique des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) : (i) une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet, (ii) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés, (v) certaines expériences complémentaires seront réalisées sur des cultures primaires. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Un total de 396 souris seront nécessaires pour le projet.

**9371**

Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires ou algues) adhérant entre eux et fixés à une surface, et enrobés dans une matrice d'exopolysaccharides protectrice et adhésive qu'ils synthétisent.

L'organisation communautaire des biofilms permet aux cellules de coopérer et d'interagir de manière différente qu'en environnement libre. Le passage d'un mode de vie à l'autre est un processus dynamique et complexe. Il est caractérisé par un changement radical de phénotype et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms, notamment l'acquisition d'une antibiorésistance et l'expression de facteurs de résistance à de nombreux stress environnementaux.

Ceci pose de graves problèmes de santé publique, notamment parce que les biofilms peuvent se former sur des implants médicaux et être à l'origine d'infections nosocomiales. Ainsi, l'implantation temporaire d'un cathéter vasculaire (abord vasculaire), d'une sonde vésicale (drainage urinaire) ou d'une sonde endotrachéale (ventilation assistée) est associée à un risque infectieux non négligeable puisqu'on estime que 60% des infections associées aux soins auraient pour origine un dispositif invasif. La physiopathologie de ces infections est étroitement liée à la construction d'un biofilm sur ces corps étrangers.

La sensibilité des biofilms aux agents antimicrobiens ne peut pas être déterminée au moyen d'essais de micro dilution standard, car ces tests reposent sur la réponse des organismes planctoniques (en suspension) plutôt que des organismes biofilm (associés à la surface). L'absence par ailleurs, d'un modèle in vitro relevant permettant de reproduire la majorité des interactions entre agent pathogène vs système immunitaire et/ou vs des antimicrobiens, nous oriente vers l'utilisation de modèles

animaux. Les modèles murins sont prédictifs d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine.

L'objectif de cette étude est de mettre au point deux modèles pré-cliniques murins de BIOFILM : (1) Modèles de cathéter-sous-cutanée et (2) Modèles de plaies chroniques.

Ces modèles permettront d'intégrer un grand nombre de caractéristiques de la pathologie humaine. Nous allons étudier ainsi l'infection (virulence, dissémination) de ces souches (souches de référence et isolats cliniques), et tester l'activité de nouveaux agents antibactériens/antibiofilm dont l'innocuité a été préalablement éprouvée par d'autres partenaires. Cette étude contribuera à apporter une première approche dans la stratégie à déployer chez les patients.

La mise en place du modèle/chirurgie sera réalisée par des personnes habilitées dans un espace dédié équipé d'une loupe binoculaire, une plaque chauffante et d'un système de monitoring (température, électrocardiogramme). Une anesthésie générale de l'animal par l'isoflurane et des traitements analgésiques seront administrés avant d'entamer les opérations chirurgicales, les antalgiques seront aussi administrés les jours suivants.

L'utilisation des systèmes d'imagerie du petit animal permettra de réduire considérablement le nombre de souris à utiliser permettant ainsi un suivi quotidien non invasif de l'infection. Le nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens.

2250 souris seront utilisées sur 5 ans, en deux procédures de classe de sévérité « modérée ».

**9372** L'innovation majeure qu'a représenté la coelioscopie dans la pratique des techniques chirurgicales a généré une très forte demande de formation. Les enseignements théoriques et surtout pratiques s'adressent aux internes, chefs de clinique comme aux chirurgiens plus confirmés ainsi qu'aux anesthésistes et infirmières de bloc opératoire.

L'objectif de notre projet est la formation chirurgicale endoscopique au travers de collaborations multidisciplinaires nationales et internationales avec plus de 5225 personnes formées sur 2715 cochons sur cinq ans.

Nous mettons en œuvre la règle des 3R en appliquant dès que possible des méthodes alternatives en adaptant les enseignements et entraînements de notre plateforme technique à chaque niveau chirurgical. Nous proposons des méthodes alternatives et complémentaires par le biais de la validation des connaissances avec des exercices de sutures sur support matériel, simulateur et pelvi trainer. A l'intérieur duquel nous utilisons des patches et des cuisses de poulet. Ces méthodes nous permettent de limiter le nombre d'animaux utilisés, cependant la chirurgie sur animaux vivants est une étape obligatoire pour la formation de nos apprenants notamment sur la surveillance et la gestion des constantes vitales ainsi que pour la dextérité des gestes chirurgicaux. Dans cette demande, le raffinement de l'utilisation des animaux est mis en œuvre via la réalisation des plusieurs interventions sur chaque animal afin limiter encore le nombre d'animaux. Le nombre de procédures par animal est limité car il s'agit de procédures sans réveil.

**9373** Le bisphénol A (BPA), reconnu comme perturbateur endocrinien, est un plastifiant utilisé afin de produire des contenants alimentaires dans l'industrie agro-alimentaire, et a des effets délétères sur la fonction reproductive (hypothalamus et gonades) des mâles et des femelles, ayant entraîné l'interdiction de son utilisation en France dans l'industrie agro-alimentaire. C'est pourquoi de nouveaux analogues du BPA, dont le bisphénol S (BPS), ont émergé afin de remplacer le BPA. Il est donc important d'étudier les effets du BPS chez l'humain, notamment avant que l'exposition environnementale du BPS augmente, les premières données obtenues suggérant que les 2 molécules (BPA et BPS) ont des effets similaires. Etant donné qu'il est difficile de réaliser une étude chez l'humain, le modèle ovin a été retenu. En effet ce modèle animal présente une plus grande proximité physiologique avec l'espèce humaine en terme de reproduction (durée du cycle œstral, durée de gestation, nombre d'ovulation) par rapport aux modèles rongeurs classiquement utilisés. Les cellules de rongeurs sont par ailleurs plus résistantes aux bisphénols (de 10 à 100 fois) par rapport aux cellules humaines. Ce projet vise à étudier comment le bisphénol S peut affecter la reproduction chez la brebis et à étudier les interactions avec le statut métabolique de l'individu. En effet, les perturbateurs endocriniens étant majoritairement solubles dans les graisses, la question de

leur accumulation dans le tissu adipeux gras reste à explorer. Ce projet consistera à exposer 2 lots de brebis, se différenciant par leur état d'engraissement (« maigres » versus « grasses »), avec 3 doses différentes de bisphénol S (0, 5 ou 50 µg/kg/jour) pendant 3 mois, via leur alimentation, puis à réaliser 2 sessions/brebis de ponction de follicules ovariens réalisées par endoscopie afin de mesurer l'impact de l'exposition au bisphénol S sur la qualité de l'ovocyte.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : pour comprendre les effets d'une exposition prolongée au bisphénol S chez l'humain, le recours à une espèce animale est nécessaire. Le modèle ovin a été retenu, car il ne présente pas de résistance naturelle à ce composé, contrairement au modèle rongeurs.

Raffinement : les brebis utilisées dans ce projet (6 groupes de 20 brebis) seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une bergerie avec aire paillée intégrale, facilité d'accès à la nourriture et à l'eau et répondant aux normes d'élevage chez cette espèce. Les animaux seront maintenus en groupes sociaux stables. Les déplacements se feront dans le calme. Les mises à jeun avant endoscopies seront limitées à 24H avec accès à l'eau jusqu'à la veille au soir de l'intervention. De plus, des traitements anesthésiques, analgésiques et anti-inflammatoires seront réalisés lors des ponctions folliculaires réalisées par endoscopie.

Réduction : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre de brebis utilisées en répétant les procédures expérimentales sur les mêmes individus. Six lots de 20 brebis sont nécessaires pour évaluer de façon croisée les effets de l'exposition au bisphénol S (à trois doses différentes) sur la qualité ovocytaire d'une part et l'impact de l'état d'engraissement de l'individu d'autre part. Un total de 120 brebis seront donc utilisées dans ce projet.

**9374** La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives fatales qui restent actuellement incurables. Le risque de développer ces maladies au cours de la vie est de 1/1000. Des analyses anatomopathologiques ont montré que les patients souffrant de la SLA et/ou de DFT présentent trois types d'inclusions protéiques impliquant les protéines TAU, TDP-43 ou FUS. TDP-43 et FUS sont des protéines de liaison à l'ARN qui régulent les différentes étapes du métabolisme de l'ARN, de la transcription au transport subcellulaire. La protéine FUS est constituée de plusieurs domaines notamment le domaine NLS pour Nuclear Localization Sequence, domaine responsable de la translocation de la protéine FUS depuis le cytoplasme, où elle est synthétisée, vers le noyau. La majorité des patients souffrant de SLA liée à une mutation de FUS présente une mutation dans ce domaine NLS. Cette mutation (homozygote) entraîne une modification de la localisation subcellulaire de FUS qui devient majoritairement cytoplasmique. Jusqu'alors, l'implication des mutations de la protéine FUS dans le développement de la SLA n'a pu être étudiée que dans des modèles murins hétérozygotes car les souris transgéniques homozygotes pour ce gène présentent une létalité périnatale. Au travers l'utilisation d'approches génétiques, nous aimerions induire la mutation homozygote de la protéine FUS chez des souris adulte (souris FUS delta NLS fl/fl inducible), afin d'induire la mutation homozygote du gène FUS, à l'image de ce que l'on retrouve chez les patients et ce à l'âge adulte. Nous aimerions voir les conséquences de cette mutation à la fois au niveau moteur, sur la protéine FUS elle-même (fonctionnement, localisation subcellulaire), mais aussi sur les protéines TAU et TDP-43. Nous avons réduit au minimum le nombre de souris nécessaire par groupe (tout en restant cohérent au regard de ce qui est nécessaire pour préserver les puissances statistiques). Nous réutilisons autant que faire se peut les souris pour plusieurs expériences et enfin nous utilisons aussi bien les mâles que les femelles. Concernant le raffinement, étant donné l'expertise de notre laboratoire dans le domaine des maladies touchant au système moteur, nous pensons nos protocoles et expériences raffinées. De même, nous sommes en mesure de détecter rapidement les troubles moteurs des souris et donc d'agir au plus vite afin de limiter la souffrance de l'animal. Enfin, au vu de la complexité des mécanismes étudiés ainsi que leur intégration dans des systèmes anatomiques interconnectant plusieurs niveaux, il n'est pas possible de remplacer le modèle murin par des modèles *in silico* ou *in vitro*. Dans la perspective du respect de l'approche des 3 R, nous avons de réduit le nombre de souris utilisé et nous proposons d'utiliser un total de 200 souris.



**9375** Les mécanismes physiopathologiques responsables de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore totalement élucidés, mais il est établi qu'il se produit dans le cerveau des patients atteints, une perte progressive des fonctions synaptiques ainsi qu'une perte neuronale appelée neurodégénérescence. Etant donné que cette dernière débute une vingtaine d'années avant l'apparition des premiers troubles comportementaux, l'élaboration de stratégies visant à renforcer la protection des neurones contre la dégénérescence de manière à prévenir, retarder, ou renverser l'apparition des premiers symptômes constitue une approche très prometteuse. L'administration intranasale directe de composés a récemment émergé comme une alternative thérapeutique aux voies orale et parentérale pour le ciblage du système nerveux central (SNC) et sera utilisée dans ce projet. Cette voie d'administration permet de façon non-invasive, à la fois de cibler efficacement le SNC et de contourner l'obstacle constitué par la barrière hémato-encéphalique, mais aussi le métabolisme hépatique pour de nombreux composés. L'hypothèse de travail guidant ce projet est qu'une administration de composés neuroprotecteurs développés dans l'équipe (antioxydants, modulateurs des récepteurs aux glucocorticoïdes...) par cette voie, permettrait de prévenir la neurodégénérescence et de retarder l'apparition et l'évolution des symptômes comportementaux de la maladie d'Alzheimer. Ce projet s'appuie sur des travaux récents de l'équipe et aura pour double objectif :

1. D'optimiser une formulation de nanovecteurs destinée à une administration par voie intranasale.
2. De déterminer l'effet neuroprotecteur des nanovecteurs enrichies en antioxydants ou autres composés neuroprotecteurs dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer.

Dans l'intégralité de ce projet, la règle des 3R sera respectée afin d'utiliser un minimum d'animaux au total, 400 rats et 616 souris. (Réduction). Une habituation des animaux aux injections intranasales (dépôt d'une goutte de solution à l'entrée des narines) sera réalisée par l'expérimentateur pour éviter le stress des animaux. Une surveillance quotidienne sera assurée lors de tous les protocoles afin de détecter très rapidement tout signe de morbidité et de procéder à des soins adaptés ou à l'euthanasie en dernier recours (Raffinement). Les méthodes d'enrichissement ne pourront être appliquées dans ce projet, dans la mesure où il a été montré qu'elles interfèrent fortement avec le comportement des animaux. Des techniques *in vitro* (culture cellulaire) seront utilisées chaque fois que le recours aux animaux ne sera pas nécessaire (Remplacement).

**9376** Il est maintenant bien établi qu'il existe une formation de nouveaux neurones tout au long de la vie dans l'hippocampe des mammifères, et que ce phénomène appelé néo-neurogenèse, joue un rôle dans la mémoire spatiale. L'hippocampe est une structure clé impliquée dans les processus mnésiques. Les neurones ainsi formés, neurones granulaires, viennent s'intégrer au sein de la population de neurones granulaires, formés durant le développement. La caractérisation de cette néo-neurogenèse, au travers de nombreuses études, peine à montrer une différence fonctionnelle entre les néo-neurones (neurones formés après la naissance) et les neurones formés durant le développement embryonnaire. Toutefois, des études menées au sein du laboratoire ont montré qu'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique, chez le rat mâle, active ou recrute spécifiquement les neurones formés à l'âge adulte mais pas les neurones nés au 7<sup>ème</sup> jour de vie (période néonatale). Ces études reposent sur des injections d'analogues de la thymidine (BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine ; CldU : 5-chloro-2'-deoxyuridine ; IdU : 5-Iodo-2'-deoxyuridine) chez des rats âgés de 7 jours ou de 2 mois. Ces analogues vont s'insérer dans l'ADN des cellules en division et permettre ainsi la visualisation de ces néo-neurones par des techniques d'immuno-histochimie. Puis après avoir soumis les animaux à un apprentissage spatial, ceux-ci ont été sacrifiés et l'activation des neurones « étiquetés XdU » a été analysée en visualisant Zif268 ou cFos qui sont des gènes d'expression précoce, en d'autres termes des marqueurs d'activité. A partir de ces données, nous étudierons le recrutement de neurones formés pendant la période embryonnaire (E18-19) et la période juvénile (âge ≤ 1mois) pour conforter un recrutement spécifique des néo-neurones dans l'apprentissage spatial. Pour cela, nous injecterons un analogue de la thymidine chez des femelles gestantes (E18-19) et des animaux juvéniles (âge ≤ 1mois). Cet analogue va s'insérer dans les cellules en division et permettre ensuite d'étudier spécifiquement les neurones nés au cours des périodes embryonnaire (E18-19) et juvénile (âge ≤ 1mois). Grâce à des techniques de double marquages immuno-histochimiques (analogue de la thymidine : BrdU + gène d'expression précoce Zif268 ou cFos), nous

pourrons étudier l'activation de ces néo-neurones suite à un apprentissage spatial. Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant les capacités cognitives de l'animal. Un tel travail ne pourrait être effectué par une approche *in vitro*, ou *in silico*, les mécanismes sous-tendant l'intégration de ces neurones étant en grande partie inconnus, complexes, et impliquant le fonctionnement du système nerveux dans son intégrité (impossible à modéliser). Nous utiliserons un total de 225 rats de la souche Sprague-Dawley. Le nombre minimal d'animaux utilisés par groupe est défini d'après les études préalablement menées au sein du laboratoire. Ce nombre tient compte des aléas des expérimentations et de la nécessité d'avoir une cohorte d'animaux statistiquement satisfaisante afin d'étudier l'activation des néo-neurones embryonnaires et juvéniles suite à un apprentissage spatial. Les approches utilisées seront raffinées notamment par l'utilisation d'analgésie en cas d'apparition de douleur ainsi que la surveillance quotidienne des animaux afin de s'assurer de leur bien être. En cas de mise en danger de ce bien être des procédures ont été mises en place et des points limites ont été définis en accord avec la vétérinaire responsable. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies avec des rondelles de nid de peuplier compressées jusqu'aux procédures comportementales où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (rondelles de nid de peuplier compressées).

**9377** La formation pratique initiale, mais également régulière des personnes utilisant des animaux à des fins scientifiques, est essentielle et indispensable au bon déroulement des procédures. Tout geste mal réalisé pourrait conduire à une atteinte du bien être des animaux et compromettre également les résultats de recherche.

Ce projet a pour objectif de permettre la formation des personnels de l'établissement aux techniques d'administrations, prélèvements et éventuellement bases de chirurgies.

Ce projet met en jeu différentes techniques à utiliser chez l'animal qu'il est indispensable de maîtriser afin d'assurer le bon déroulement du projet et d'éviter toute atteinte au bien être des animaux. La formation du personnel à ces techniques sur des animaux vivants est donc essentielle.

Nous projetons d'utiliser pour les besoins de formation 2 500 animaux sur 5 ans, répartis en 500 rats et 2 000 souris.

La bonne formation du personnel utilisant des animaux à des fins scientifiques participe au principe des 3 R's : Raffinement des procédures réalisées. Pour les besoins de formation, les animaux non utilisés issus de nos élevages internes seront utilisés, ainsi que les animaux commandés mais non utilisés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, nous veillerons à utiliser un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'acquisition de gestes corrects et reproductibles. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance, l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, protocoles d'anesthésie-analgésie adaptés).

**9378** L'obésité, étant associée à de nombreuses pathologies graves (diabète de type II, atteintes vasculaires, hypertension, maladies neurodégénératives, certains cancers), cette pathologie constitue sans conteste un des principaux challenges de santé publique du XXIème siècle. Une consommation excessive d'aliments riches en graisses explique, en partie, ce phénomène.

Notre équipe a récemment montré chez la souris qu'il existait un système de détection gustatif des lipides alimentaires qui serait impliqué dans la sélection et la digestion des aliments riches en graisses. Ces données inédites suggèrent l'existence d'une 6ème modalité gustative : le « goût du gras ».

Nos travaux récents indiquent qu'il existe une diminution de la capacité à identifier correctement les lipides alimentaires chez la souris rendue obèse par un régime hyper gras. Nous avons montré que cette altération est liée à une dérégulation du système de détection des lipides au niveau des papilles gustatives. Ce changement s'accompagne d'une modification du comportement alimentaire se traduisant par une consommation préférentielle d'aliments riches en graisses.

A ce jour les mécanismes moléculaires responsables de cette dérégulation du « goût du gras » ne sont pas connus. Une des pistes sérieuses est l'altération de la voie de synthèse de la

sérotonine/mélatonine se mettant en place avec l'obésité et aboutissant à la production d'un composé (acide quinolinique) neurotoxique susceptible d'altérer le comportement alimentaire. L'objectif de ce projet sera de déterminer le rôle propre de ce composé sur l'altération de la détection gustative des graisses lors de l'obésité et ses conséquences sur les choix alimentaires et la santé.

Cette expérimentation met en jeu des techniques d'étude du comportement alimentaire irréalisables in vitro, et nécessite donc l'utilisation de souris. Pour cela, des micro-pompes permettant la diffusion d'acide quinolinique seront implantées sous anesthésie aux souris, pour mimer le phénomène observé au cours de l'obésité. A la suite de cette implantation, les animaux participeront à des tests de comportement alimentaire afin de déterminer si leur capacité à détecter les nutriments a été altérée.

Ce projet est en adéquation avec la règle des 3R :

Le Remplacement n'est pas envisageable car ce projet a pour objectifs de réaliser une étude comportementale et de physiologie du goût, rendant indispensable l'usage du modèle animal. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum. Au total, 30 souris seront utilisées pour garantir une analyse statistique fiable. Le Raffinement sera garanti par l'hébergement des souris dans des conditions optimales avec de l'enrichissement (frisottis de carton et buchette de bois à ronger) et ainsi qu'un suivi quotidien de leur état général. Les souris seront opérées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle grâce à une table chauffante spécifique et après injection d'un analgésique pour le traitement de la douleur inhérente à l'opération. L'injection d'analgésique pourra être répétée en post-opératoire en fonction de la présence de signes de douleur.

Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. De plus, un nombre restreint de personnes interviendront afin de limiter le stress des animaux. Ce personnel dispose d'une formation adéquate et est compétent pour détecter précocement l'un des points limites définis pour ce projet.

**9379** La schizophrénie est une maladie psychiatrique liée à des troubles du développement du système nerveux, et à l'origine génétique complexe. Elle est considérée comme une des dix premières causes de handicap à long terme, et à ce titre a un fort coût économique associé. Des médicaments existent pour gérer les symptômes des patients mais aucun qui ne guérisse cette maladie. De récentes études génétiques ont démontré que les gènes codant pour les sous-unités des récepteurs nicotiques sont fortement liés à la schizophrénie. Le tabagisme est largement plus prévalent chez les patients schizophrènes que dans la population générale, et les gènes codant pour les sous-unités nicotiques sont impliqués dans le développement du cerveau.

L'étude vise à apporter des arguments supportant la notion que des mutations présentes sur les gènes codant pour les sous-unités nicotiques sont impliquées dans les problèmes de développement qui sont à l'origine de la schizophrénie. Pour cela, nous rechercherons l'effet sur le long terme de la présence de ces mutations sur la morphologie structurale de neurones en développement d'origine humaine, transplantés dans le cortex moteur de souris. Nous utiliserons des souris ayant un déficit immunitaire pour limiter le rejet naturel des cellules humaines, pour permettre une étude comportant un traitement sur plusieurs mois.

Ce projet utilisera 1720 animaux, dans 4 procédures (2 procédures sévères, 1 modérée et une légère).

Le bénéfice attendu du projet est une nouvelle cible thérapeutique pour soigner la schizophrénie et ses symptômes de manière plus efficace.

Les opérations chirurgicales seront menées sous anesthésie générale. Elles seront suivies d'une période de surveillance bi-quotidienne avec recours à des antalgiques. Les animaux seront euthanasiés en fin d'étude pour analyse des cerveaux.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'objectif de cette étude est d'analyser l'effet des mutations sur le développement des cellules humaines in vivo, dans un environnement le plus proche possible des conditions rencontrées dans le cadre du développement humain, et leur intégration dans l'architecture complexe du cerveau.

Nous utiliserons le minimum d'animaux requis, pour pouvoir utiliser les statistiques adéquates nous permettant d'apporter une conclusion à l'issue de l'obtention des données expérimentales.

Les souris immuno-déficientes seront maintenues dans un environnement protégé pour prévenir le risque d'infection.

**9380** Les bactéries intestinales, ou microbiote intestinal, participent à de nombreux processus physiologiques. Chez les patients atteints de cancer, la composition du microbiote peut affecter l'efficacité des traitements. Certaines bactéries intestinales sont nécessaires à l'efficacité de certaines chimiothérapies, et leur absence peut avoir des conséquences néfastes sur l'efficacité anti-tumorale de ces traitements, en particulier au niveau de l'immunité anti-tumorale. *Enterococcus hirae* a été identifié comme bactérie commensale immunogène capable de moduler l'efficacité anticancéreuse du cyclophosphamide (CTX).

Le CTX induit la translocation d'*E. hirae*, c'est-à-dire le transit de la bactérie à travers l'épithélium intestinal, et la dissémination vers les sites distaux comprenant les organes lymphoïdes secondaires et l'environnement tumoral. Nous souhaitons approfondir les mécanismes d'action d'*Enterococcus hirae* afin d'améliorer cliniquement les réponses aux traitements anticancéreux.

Nos objectifs sont les suivants :

1. Etudier la translocation d'*Enterococcus hirae* marquée par fluorescence, induite par la chimiothérapie CTX, et l'interaction des bactéries avec les cellules immunitaires de l'hôte
2. Etudier les molécules libérées par *Enterococcus hirae* impliquées dans la modulation de la progression tumorale, et leur interaction avec les cellules immunitaires de l'hôte

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les modèles de tumeur disponibles ont été développés chez la souris et sont indispensables à l'étude du microbiote intestinal et de l'immunité anti-tumorale après traitement par chimiothérapie.

Cette étude impliquera les techniques suivantes (pas tous dans un protocole) :

1. Inoculation d'une tumeur par injection sous-cutanée
2. Injection de CTX
3. Administration d'antibiotiques dans le biberon
4. Transplantation de matière fécale humaines
5. Administration orale d'*Enterococcus hirae* ou des dérivés par sonde de gavage
6. Imagerie d'animaux vivants par le système d'imagerie in vivo (IVIS)
7. Chirurgie ligature iléale de courte durée (sans réveil)

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, car les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques.

Durant ce projet, 5100 souris seront utilisées pendant la période décrite de 5 ans. Les données préliminaires obtenues au laboratoire montrent que pour voir les effets d'*Enterococcus hirae* sur la progression de la tumeur pendant le traitement CTX, il faut réaliser 3 expériences indépendantes contenant 5 souris par groupe de voir un effet statistiquement significatif. Au vu du nombre d'animaux utilisé par groupe, des tests statistiques non paramétriques seront utilisés. Lors d'une comparaison de l'ensemble des groupes par rapport au groupe témoin, un test de Kruskal-Wallis sera utilisé. Les groupes seront comparés deux à deux à l'aide du test de Mann Whitney. Enfin, les manipulations seront réalisées par les personnel formé et compétent dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

Pendant l'expérimentation, les souris seront observées par un chercheur compétent quotidiennement et euthasiées en cas d'atteinte des points limites. Le modèle de tumeur utilisé n'est pas invasif ; la formation de tumeurs distale au site d'injection est rare, et également un point limite.

En concernant l'anesthésie utilisé dans ce projet, l'anesthésie injectable utilisée sera un mélange de xylazine et ketamine, et isofluorane sera utilisé pour l'anesthésie gazeuse.

Pour réaliser notre expérience, nous utiliserons une chimiothérapie par cyclophosphamide (CTX) et des traitements antibiotiques par un cocktail d'ampicilline, vancomycine, collistine et de streptomycine.

Cette autorisation de demande comprend 12 procédures.

- 11 classe modérée
- 1 classe sans réveil

Toutes les souris sont âgées d'au moins 7 semaines (maturité sexuelle). Les femelles sont utilisées pour éviter les effets d'un comportement agressif qui augmenterait le stress chez les souris infectées par une tumeur.

**9381** Les maladies cardiovasculaires continuent d'être une des causes de mortalité principales, ni seulement en France mais dans le monde entier. Les concentrations sanguines élevées en lipides (cholestérol et triglycérides) représentent un facteur de risque majeur pour le développement des maladies cardiovasculaires, avec une incidence notamment élevée chez les patients diabétiques. La découverte en 2003 de la pro-protéine Convertase Subtilisine Kexine de type 9 (PCSK9) a été une révolution dans la compréhension de la physiopathologie des dyslipidémies. PCSK9 est un inhibiteur du récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLR) et augmente ainsi les concentrations plasmatiques de cholestérol, un rôle qui a fait de PCSK9 une cible thérapeutique très prometteuse pour combattre les maladies cardiovasculaires. Par contre, la fonction et la régulation exacte de PCSK9, sa cible le LDLR et ses partenaires dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des triglycérides reste aujourd'hui encore mal comprises, particulièrement chez les patients diabétiques. Cependant notre objectif est de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans le foie et l'intestin, deux organes déterminants dans le métabolisme lipidique.

Ce projet se divise en 3 axes, pour lesquels nous aurions besoin de 2734 souris maximum.

Le premier axe (protocoles en couleur verte) vise à étudier l'impact de l'absence de PCSK9, LDLR et/ou la présence d'une situation diabétique sur la réponse physiologique suite aux stimuli métaboliques, tel qu'un jeun. Ces études seront effectuées à l'aide de modèles de souris génétiquement modifiées, les modèles de souris rendues diabétiques à l'aide de streptozotocine et les souris surexprimant PCSK9 par injection avec adénovirus. Pour ces expériences nous utiliserons généralement 8 souris par lot, et entre 2 et 4 lots de souris, comme spécifié dans le tableau sous 3.4.10, à l'exception des souris données un régime enrichi en acides gras (12 souris par lot), pour un total de 790 souris.

Dans l'axe 2 (protocoles en couleur orange), nous déterminons l'impact de l'absence de PCSK9, LDLR et/ou la présence d'un diabète sur la sécrétion et absorption des lipides par le foie. Pour cela, nous utilisons des souris rendues diabétiques soit par le streptozotocine soit par le régime enrichi en acides gras (comme décrit sous l'axe 1, souris comptées sous axe 1) soit par des modèles de souris génétiquement modifiées. Comme spécifié dans le tableau sous 3.4.10, nous utiliserons 8 souris par lot, et entre 2 et 4 lots par manipulation, pour un total de 1208 souris, à l'exception des souris données un régime enrichi en acides gras (12 souris par lot).

Le dernier aspect du projet (protocoles en couleur bleue) vise à comprendre l'impact de l'absence de LDLR et/ou la présence d'une situation diabétique sur la sécrétion et absorption des lipides par l'intestin (l'impact de l'absence de PCSK9 étant le sujet d'une autre saisine). D'un côté nous testerons l'absorption et la sécrétion des lipoprotéines riches en acides gras par l'intestin, et de l'autre côté nous regardons l'absorption et la sécrétion de cholestérol chez les souris rendues diabétiques par un régime enrichie en acides gras et/ou les modèles de souris génétiquement modifiées pour le LDLR. Comme spécifié dans le tableau sous 3.4.10, nous utiliserons 8 souris par lot, et 2 lots de souris par manipulation, à l'exception des souris données un régime enrichi en acides gras (12 souris par lot), pour un total de 736 souris.

Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « les trois R ». Effectivement, nous essayons d'exécuter une grande partie du travail de base, nécessaire pour répondre aux objectifs comme défini sous 3.3.1, in vitro. Pour valider nos données obtenues in vitro et pour analyser la sécrétion des lipoprotéines dans un contexte physiologique et physiopathologique, nous sommes ensuite obligés d'utiliser les modèles animales. Par contre, seules les expériences indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre de souris nécessaires pour chaque expérimentation a été défini statistiquement en utilisant nos anciennes données obtenues par les mêmes types d'expériences. Egalement, les procédures ont été réfléchies pour réduire au maximum le stress et les souffrances des souris soumises aux expérimentations. Comme le

métabolisme des lipides est une situation physiologique complexe dont plusieurs organes participent, il n'existe pas à l'heure de méthodes ex vivo/in vitro pour remplacer les expérimentations animales.

**9382** La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative, caractérisée par la destruction des neurones dopaminergiques du cerveau. Ces neurones sont impliqués dans le contrôle de la motricité corporelle. La progression de la maladie pourrait être due à la propagation d'agrégats d'une protéine appelée  $\alpha$ -synucléine, d'un neurone à l'autre, provoquant finalement la mort des neurones atteints. Il est donc important de comprendre comment ces agrégats se propagent au sein du cerveau. Notre laboratoire a déjà identifié des mécanismes permettant le transfert de composés entre les cellules, mettant en jeu des protéines particulières. Nous cherchons à savoir si ces mécanismes, et ces protéines, sont utilisés également pour la propagation des agrégats protéiques d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau. Pour cela le recours à l'animal est nécessaire. Dans ce projet, nous allons déterminer si, dans le cerveau de souris adultes, les agrégats d' $\alpha$ -synucléine sont transférés entre les neurones et si la propagation de la pathologie peut être réduite. Pour la conception expérimentale de ce projet, la règle des 3Rs (remplacer, réduire, raffiner) a été prise en compte. Nous mettrons en œuvre pour chaque expérimentation : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, 2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une euthanasie, 4) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 5) une valorisation de chaque animal par l'analyse de chaque cerveau. Pour ce projet nous utiliserons au total 240 souris sur 5 ans. Une seule procédure expérimentale de sévérité modérée par animal sera utilisée pour ce projet : l'injection intracérébrale de la protéine  $\alpha$ -synucléine suivi de perfusion intracardiaque d'un fixateur. Ce projet nous permettra d'obtenir des informations sur la cascade d'événements qui conduisent à la colonisation du cerveau par des agrégats  $\alpha$ -synucléine et apportera les bases pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à ralentir ou arrêter la progression de la maladie.

**9383** L'obésité est un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Notre recherche s'intéresse aux bases neurobiologiques de l'obésité, avec une emphase pour le rôle d'un récepteur des sels biliaires, appelé TGR5 (Takeda G-protein-coupled receptor 5), dans l'hypothalamus, qui est une structure cérébrale réglant la prise alimentaire et le métabolisme. Nos études préliminaires ont montré que l'activation pharmacologique du TGR5 à niveau de l'hypothalamus permet la perte du poids et une amélioration de la glycémie dans des souris rendues obèses par un régime riche en graisses. Nos études montrent que l'activation du TGR5 entraîne l'activité de neurones hypothalamiques à pro-opiomelanocortine (POMC), qui sont connues avoir un rôle clé dans la physiopathologie de l'obésité. Notre objectif est donc de comprendre si le TGR5 exprimé par les neurones à POMC est impliqué dans le contrôle de la balance énergétique et dans l'obésité.

Ainsi, le présent projet a pour but de générer une nouvelle lignée transgénique en croisant de lignées déjà existantes dans notre laboratoire en vue de supprimer l'expression du récepteur TGR5 spécifiquement et de façon inductible dans les neurones à POMC hypothalamique de la souris adulte. L'approche méthodologique utilisée repose sur l'utilisation de souris transgéniques obtenues par la stratégie génétique dite « Cre-LoxP inductible », ciblée dans les neurones à POMC. Cette stratégie justifie l'utilisation de la souris, qui est l'espèce de choix pour cette transgénèse particulière. Il n'existe pas de méthode alternative pour l'objectif de ce projet.

Ici nous évaluerons si le phénotype de cette nouvelle lignée est dommageable ou non en réalisant un suivi du développement, de la naissance jusqu'à l'âge adulte.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes (DIRECTIVE 2010/63/UE) et françaises (Décret no. 2013-118), et respectent les standards de soin et de bien être des animaux. Ce projet suit les recommandations du réseau ROCAD pour l'évaluation de la sévérité des phénotypes des lignées de souris génétiquement modifiées. Nous faisons attention à utiliser le moins d'animaux possible. Pour cela, nous effectuons une évaluation sur un échantillon représentatif de 14 souris nouveau-nés que nous suivons jusqu'à l'âge adulte. Cette quantité a été estimée grâce à des calculs de puissance statistique nous permettant de faire des conclusions solides à la fin de notre évaluation. Afin de garantir le bien être des souris et de réduire le stress de

l'isolement, elles seront mises dans des cages d'hébergement collectives avec différents enrichissements, ce qui permet d'améliorer leurs conditions de vie, tels que des bâtonnets en bois, des carrés de cellulose pour la nidification et des tunnels, ainsi que des structures solides pour jouer, rester dans le noir ou se cacher. Elles seront hébergées dans des conditions idéales de température avec un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Aucune intervention douloureuse n'est prévue pour ces animaux. Enfin, aucun remplacement ne pourra être envisagé puisque cette saisine a pour objectif d'évaluer le phénotype des animaux transgéniques générés.

**9384**

La formation au métier de chirurgien, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire requiert, à la différence de nombreuses disciplines médicales, un enseignement technique nécessaire à l'accomplissement des interventions chirurgicales. L'avènement des nouvelles techniques de communications et les progrès des ressources audiovisuels ont permis de grands progrès éducatifs. Cependant, la chirurgie reste un domaine technique où aucun apprentissage théorique ne pourra remplacer l'apprentissage technique.

En médecine vétérinaire des carnivores domestiques, la chirurgie fait partie du quotidien de tous les praticiens tant en convenance (par exemple stérilisation) où une obligation de résultat est présente, que dans un contexte pathologique (chirurgie de l'intestin et de l'estomac lors d'ingestion de corps étranger, retrait de calculs vésicaux, exérèse de rein...).

Cependant la chirurgie nécessite un apprentissage spécifique qui doit se faire en dehors de l'exercice clinique quotidien sur les patients et la mise en place d'un enseignement structuré en dehors du bloc opératoire est une nécessité. Depuis quelques années des simulateurs chirurgicaux se sont développés; cependant pour des raisons inhérentes à leur disponibilité, leur coût, l'absence de développement pour le milieu et les indications opératoires vétérinaires, l'entraînement sur animal reste la référence. De plus, une étude récente met en évidence que la formation chirurgicale sur animal des chirurgiens reste à l'heure actuelle la plus formatrice des techniques d'apprentissage.

La chirurgie sur l'animal est en effet un exercice plus proche de la réalité. Son but est de permettre la réalisation d'interventions chirurgicales dans des conditions d'autonomie opératoire. De plus, ceci stimule la réflexion sur la gestuelle et les stratégies opératoires.

Pour ce type de formation, deux chirurgiens par animal sont l'optimal. Nous envisageons de former 4x4 chirurgiens par an environ, soit un nombre de 8 cochons sur l'année concernée par le présent projet.

Le but du projet est donc de proposer un enseignement spécialisé de chirurgie viscérale vétérinaire sur animal vivant (cochon) afin de pouvoir proposer une formation permettant d'éviter l'apprentissage sur le patient. Une attention particulière sera prise au respect de la règle des 3R.

- Remplacement : l'entraînement final sur animal vivant car aucun protocole in vitro ou ex vivo ne permet de reproduire correctement les conditions rencontrées en cours de chirurgie. En particulier, la nature des tissus vivants et les flux sanguins. L'anatomie du cochon, notamment au niveau intestinal et de l'appareil urinaire sont plus proches de ceux rencontrés chez le chien ou le chat que ce qui est observé chez des modèles petits animaux type rongeurs ou lagomorphe.

- Raffinement : Une formation théorique au bonne pratique chirurgicale et d'essai sur animaux vivant sera réalisée avant la formation pratique. Les essais proposés ne requièrent pas de suivi post-opératoire ni que les animaux soient en état éveillé. Les animaux seraient donc endormis pendant les essais en chirurgie ouverte et euthanasiés sans réveil.

- Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux tout en permettant un bon apprentissage pratique un cochon pour 2 participants sera envisagé.

**9385**

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des maladies neurodégénératives, et touchera environ 3 millions de personnes en France en 2020. Il n'existe pas à ce jour de médicaments efficaces et il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux traitements capables de stopper ou de ralentir la maladie.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de molécules à visée thérapeutique sur les caractéristiques comportementales et biochimiques de la maladie d'Alzheimer. Des études sur cultures cellulaires ont été réalisées et ont confirmé les propriétés neuroprotectrices de notre

composé. Des études pré-cliniques sont maintenant nécessaires pour étudier les effets de ces nouveaux traitements potentiels sur des modèles animaux reproduisant la maladie. Cette étude sera réalisée sur des modèles animaux expérimentaux (rats ou souris) bien caractérisés dans la littérature. Pour chaque modèle étudié, les animaux effectueront des tests comportementaux mesurant les capacités de mémorisation, et les effets des traitements étudiés seront ainsi mesurés dans ces tests. Plusieurs tests comportementaux seront utilisés pour le même animal (2 tests), afin de réduire le nombre total d'animaux nécessaires. A la fin de l'étude comportementale, une étude biochimique sera réalisée sur les tissus prélevés afin d'identifier les mécanismes d'action impliqués dans la maladie et dans les effets du composé étudié.

Le nombre d'animaux que nous prévoyons pour mener à bien ce projet est le nombre minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement analysables, selon les données de la littérature.

Soit, par composé étudié : 4 modèles animaux x 9 groupes (contrôles, alzheimer non traités, alzheimer traités composé à 4 doses différentes, contrôles traités nouveau composé à dose minimale et maximale, alzheimer + molécule de référence) x 12 animaux par groupe (rat ou souris) x 3 durée de traitement = 1296 animaux par composé étudié.

Au maximum 2 composés (une molécule et son dérivé) seront étudiés sur une période de 5 ans, sur des animaux mâles et femelles, soit  $1296 \times 2$  composés  $\times 2$  genres = 5184 rats ou souris au total pour ce projet.

L'induction de la pathologie est réalisée par administration d'une substance sous anesthésie générale et locale. Les animaux sont ensuite observés quotidiennement, et la survenue d'un état de stress ou souffrance seront potentiellement identifiés à l'aide de points limites définis au préalable. De plus, les animaux seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi.

**9386** Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

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

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie cardiovasculaire (ex : stent, réparation ou remplacement de valve cardiaque ...). Les porcins et les petits ruminants sont alors des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. Les lagomorphes peuvent aussi être utilisés dans certains cas particuliers. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de



sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 290 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les petits ruminants et les porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux. De plus, les petits ruminants sont le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments et des jouets sont disponibles. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (jouets pour les porcins/chiens et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et une structure du bien être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

**9387** La bactérie *Propionibacterium acnes* ou *P. acnes* est responsable de l'acné inflammatoire chez l'homme. Plusieurs types de traitements contre l'acné sont commercialisés et se répartissent en 3 catégories : les antibiotiques qui vont cibler préférentiellement la bactérie ; les rétinoïdes qui vont diminuer la production de sébum et les anti-inflammatoires.

Si certains de ces traitements sont relativement efficaces pour traiter l'acné (anti-rétinoïdes), des inconvénients majeurs existent : forte résistance de la bactérie aux antibiotiques, destruction des cellules du foie, contre-indication pour les femmes enceintes dans le cas des rétinoïdes, dessèchement important de la peau pour les anti-inflammatoires.

Le but du projet est de tester de nouvelles molécules efficaces avec peu d'effets secondaires. Des molécules peptidiques et chimiques, ayant la capacité d'inhiber in vitro l'adhésion et l'inflammation provoquée par *P. acnes* sur les cellules de la peau, ont été mises au point. Le projet propose d'étudier leur capacité à diminuer la réponse inflammatoire induite par *P. acnes* dans les lobes d'oreilles de souris. Des tests in vitro ont permis de sélectionner les molécules les plus intéressantes à tester in vivo mais la biodistribution et la demie-vie des molécules dans le sang ne peuvent être évaluées qu'in vivo.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Cette étude nécessitera 240 souris afin d'avoir des données statistiques significativement exploitables.

Les procédures d'injection seront réalisées sous anesthésie générale afin que les animaux ne souffrent pas, une surveillance journalière et des points limites sont également prévus.

Un prélèvement sanguin permettra d'analyser les paramètres inflammatoires avant euthanasie des animaux.

Cette étude pourrait aboutir à la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques pour le traitement de l'acné et nous conduire à les tester en phase I et II.

**9388** Ce projet a pour d'étudier, dans un modèle de rat dépressif, les effets d'une stimulation profonde du faisceau médian du télencéphale (FMT) sur des paramètres électrophysiologiques, neurochimiques et comportementaux dans un modèle de rats dépressifs (FSL, pour Flinders Sensitive Line). Ces rats sont sélectionnés sur la base de leur réponse comportementale lors du test de la nage forcée dans un cylindre; lors de ce test un profil dépressif est attribué sur la base du comportement des rats, c'est à dire aux rats montrant majoritairement un comportement de passivité (flotement), par rapport à des rats non dépressifs qui vont générer de manière plus importante des mouvements de fuite en nageant. Ainsi, il s'agira d'appliquer la technique de stimulation électrique profonde du FMT, qui contient notamment les voies monoaminergiques (dopamine, sérotonine), afin de rétablir un fonctionnement normal de ces dernières. Cette technique est notamment appliquée chez l'Humain dans le cadre de la maladie de Parkinson, et avant de la proposer dans le cadre de la dépression il s'agit de la valider au niveau pré-clinique.

Plusieurs procédures expérimentales seront proposées. Nous enregistrerons, en cage d'élevage, l'activité électrophysiologique des structures clés de la dépression (cortex préfrontal, noyau accumbens, hippocampe, habénula latérale) avant et après la stimulation ; ainsi, nous pourrions corrélérer les effets bénéfiques de cette stimulation à des modifications du niveau de communication au sein du réseau cérébral étudié. De plus nous observerons les effets comportementaux bénéfiques de la stimulation sur le profil dépressif à l'aide du test de la nage forcée. Enfin, nous procéderons à l'étude des effets de la stimulation sur les paramètres neurochimiques cérébraux (monoamines, i.e., dopamine et sérotonine) dans les structures d'intérêt. Enfin, l'un des aspects importants de l'étude, qui permettra d'ajuster les traitements chez l'Humain, est l'observation des effets de stimulations courtes et longues; ainsi nous utiliserons dans ce projets deux durées de stimulation, 2 heures ou 24 heures.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 180 rats qui seront fournis au laboratoire par un partenaire ; pour moitié ces rats seront des rats dépressifs, et pour moitié des rats témoins non dépressifs.

Règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste des prérequis statistiques, ces dernières étant effectuées à l'aide de statistiques paramétriques ; de plus, les animaux effectueront toutes les procédures comportementales dans un souci de réduction. Raffinement : le choix des tests a été guidé par leur validité dans le domaine et le choix de l'espèce - Rat - par son adaptation naturelle à réaliser ces tests avec un minimum de stress ; tout sera mis en œuvre pour préserver le bien être des animaux lors de la procédure chirurgicale réalisée sous anesthésie générale (couverture chauffante, administration d'un analgésique local, d'un antidouleur et d'un antibiotique) et lors de la phase de récupération post-chirurgicale (suivi post-opératoire régulier). Remplacement : dans la mesure où il s'agit ici d'étudier la communication au sein d'un réseau cérébral lors de l'accomplissement de tests comportementaux explorant des symptômes liés à la dépression, il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles.

**9389** Il s'agit d'une série de 5 travaux pratiques destinée à des étudiants de Master. Parmi ces 5 TP, seuls trois impliquent l'utilisation d'animaux (rats). Ces TP ont pour but d'étudier les processus mnésiques, à la fois chez l'animal et chez l'homme, avec différentes approches comportementales (tests adaptés à l'espèce étudiée), et différentes techniques d'études de la plasticité neuronale sous-jacente à ces processus mnésiques. Il s'agit de faire prendre conscience aux étudiants que l'on peut étudier des processus cognitifs communs à différentes espèces animales ainsi que les modifications neurobiologiques qui en découlent, mais qu'il faut adapter à l'espèce étudiée les tests comportementaux et les niveaux d'approches (techniques d'études) de la plasticité nerveuse. Ces TP visent aussi à familiariser les étudiants à une large panoplie de techniques (comportementales, moléculaire, électrophysiologiques, chez l'homme et chez l'animal) par une participation active (3 à 4 étudiants maximum). La demande d'autorisation expérimentale porte sur les deux premiers TP. Le premier TP (TP1), d'électrophysiologie, vise à étudier l'induction et le maintiens de la potentialisation à long terme (PLT) dans le gyrus dentelé de l'hippocampe de rat anesthésié (rat, n=3). Le deuxième TP (TP2) porte sur l'analyse comportementale des capacités cognitives de rats dans le domaine spatial (hippocampo-dépendant, n=5) et non spatial (qui ne repose pas sur l'intégrité de l'hippocampe, n=5). Ces deux TP sont suivis par un troisième (TP3) dont l'objectif est d'évaluer l'expression de gènes de sialyltransférases, marqueur d'une plasticité synaptique, par PCR quantitative, dans les cerveaux des rats utilisés lors des TP1 et TP2. Soixante-cinq rats seront donc utilisés sur une durée de 5 ans. Les deux derniers TP (qui ne font pas l'objet de la présente demande d'autorisation, mais qui font partie de la série de TP que suivront les étudiants) portent, pour l'un (TP4) sur l'analyse comportementale des capacités cognitives spatiales chez l'homme (pour faire le pendant au TP2), pour l'autre (TP5) sur la mise en évidence d'indices électrophysiologiques (EEG, P300) chez l'homme lors de tâches mnésiques. L'ensemble des résultats obtenus est analysé pour l'année en cours, mais est également mis en perspectives avec un corpus de résultats obtenus les années précédentes afin de préparer un travail sur le traitement statistique des données. Enfin une discussion sur l'éthique et l'expérimentation est engagée dans le cadre de travaux dirigés à l'issue de la phase expérimentale. Comme indiqué ci-dessus, ces TP doivent permettre de comparer des processus cognitifs chez l'Humain et l'animal, et d'entraîner les étudiants à la chirurgie animale. L'utilisation d'animaux est donc incontournable (3R : Remplacement). L'accumulation des données aux cours des années

permet de limiter le nombre d'animaux utilisés tout en constituant un corpus de données exploitables (3R : Réduction). Les animaux sont hébergés à plusieurs par cage et font l'objet d'un contrôle quotidien par le personnel formé et qualifié de l'animalerie, et l'absence d'atteinte de point limite est surveillée (3R : Raffinement).

**9390** L'endobrachyoesophage (EBO) est une pathologie fréquente à risque d'évolution vers une muqueuse précancéreuse puis un cancer de l'oesophage. En cas de dysplasie ou de cancer in situ il est recommandé d'éradiquer l'EBO. Les techniques de destruction endoscopique utilisées à ce jour sont essentiellement thermiques par radiofréquence (RF) ou par application de plasma Argon (APC). Une des problématiques majeures de ces méthodes de destruction est l'impossibilité d'obtenir une analyse histologique de l'EBO détruit. Une nouvelle technique de résection couplée à une aspiration, permet la résection de l'EBO et son analyse histologique. Aucune étude n'a évalué le risque de complication à type de sténose œsophagienne de cette nouvelle technique de résection endoscopique. Les sténoses sont responsables de troubles majeures de l'alimentation avec une nette altération de la qualité de vie. L'objectif de l'étude est d'évaluer la survenue de sténoses œsophagienne après résection endoscopique de la muqueuse de l'œsophage, avant de transposer cette prise en charge chez l'homme. Le modèle porcin vivant anesthésié est le modèle permettant une transposition la plus proche des risques de complications chez l'homme. Le modèle animal vivant ne peut être remplacé dans cet objectif par des modèles ex-vivo en raison de l'évolutivité du risque de survenue de la sténose apparaissant fréquemment au quinzième jour après la résection. Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R : après des essais préalables sur simulateur, une première phase est prévue avec 6 porcs pour évaluer cette technique. Au besoin et selon les résultats, un deuxième groupe de 6 porcs est envisagé après modification de la technique. Le nombre total de porcs nécessaires à la réalisation de ce projet est donc de 12 au maximum pour une durée de 2 ans. Pour éviter toute souffrance aux animaux, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée afin d'anticiper si nécessaire les douleurs. L'état de santé des porcs sera suivi régulièrement. Dans le cas où le traitement endoscopique serait à l'origine de douleurs visibles non soulagées par les antalgiques, de détresse ou de difficulté d'alimentation importante, le traitement sera interrompu et, si nécessaire, l'euthanasie de l'animal sera anticipée. Il s'agit de la première étude qui évalue les risques et effets secondaires d'une résection endoscopique par aspiration de l'EBO. Cette étude animale justifiera l'application humaine par la suite. Ce qui permettra de définir au préalable les risques de sténose, avant son application clinique chez l'homme.

**9391** L'autisme est un trouble complexe du comportement encore mal connu et mal traité, caractérisé notamment par des altérations de la communication. Les études précédentes réalisées au laboratoire ont permis de montrer que l'ocytocine, hormone connue pour son rôle dans l'accouchement et la lactation, jouerait également un rôle important dans la régulation du comportement social chez l'homme. L'administration d'ocytocine améliore notamment les capacités sociales de patients autistes. Même si la recherche dans ce domaine est en forte progression, des questions fondamentales sur les mécanismes à l'origine de cette maladie persistent. Ainsi, le principal objectif de ce projet est de déterminer le rôle des neurones ocytocynergiques dans la genèse des troubles sociaux et cognitifs. En manipulant de façon sélective et réversible, le système ocytocynergique dans le cerveau, nous pourrions établir un lien causal entre l'activité des neurones ocytocynergiques et les troubles comportementaux. Ce projet d'une durée de 5 ans a été élaboré pour répondre à des questions fondamentales sur la compréhension des troubles du comportement social et permettra de développer de nouvelles thérapies basées sur des mécanismes biologiques, tout en adoptant une approche expérimentale respectueuse de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), préconisée pour une recherche sur l'animal à des fins scientifiques et cliniques. Comme notre projet de recherche porte

sur la communication sociale, les études in vitro ou la modélisation ne peuvent pas constituer un modèle expérimental satisfaisant.

Afin de permettre une transposition chez l'homme des résultats obtenus dans notre étude, nous planifions d'utiliser un modèle animal phylogénétiquement proche de l'humain, le primate non-humain, et en particulier le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) qui possède un système social complexe et hiérarchisé, reposant sur des alliances entre individus (famille, groupe « d'amis »). Ce modèle animal permettra ainsi de modéliser des comportements humains, observés chez l'individu normal et mis à défaut par exemple dans les pathologies telles que l'autisme ou l'anxiété sociale. De plus, d'un point de vue neuroanatomique, le primate non humain présente une anatomie cérébrale très proche de celle de l'homme. En effet, le système des voies visuelles est parallèle à celui de l'homme et permet au singe de percevoir le monde qui l'entoure de façon identique à l'homme (couleur, déplacement, stéréoscopie). De plus, des données neurologiques ont montré que les primates non humains disposent tout comme l'homme d'aires cérébrales dédiées aux stimuli sociaux (ex : aires des visages) qui n'existent probablement pas chez d'autres mammifères tels que les rongeurs chez lequel les interactions interindividuelles sont moins riches. Ainsi, les expériences visant à comprendre les bases neurales de l'action de l'ocytocine peuvent s'appuyer sur cette double homologie, qui fait du macaque rhésus le modèle animal préclinique le plus proche de l'homme.

L'étude chez le primate non humain est donc irremplaçable par une autre espèce animale et ouvre des perspectives thérapeutiques avec un fort impact sur la santé et la société. Un nombre maximum de 6 animaux (1 lot de 2 + 4 animaux) exposés à un ensemble de procédures expérimentales réversibles (légères et modérées) permettra de généraliser statistiquement les résultats obtenus (réduction minimale pour généraliser les effets, compte tenu de la variabilité interindividuelle). Dans un premier temps, 2 animaux seront utilisés pour valider l'ensemble de l'approche expérimentale. Pour cette étude pilote, nous chercherons à observer des modifications comportementales spontanées telles que des diminutions/augmentations des interactions avec les congénères. Les 2 premiers animaux seront euthanasiés pour permettre une étude histologique post-mortem indispensable à l'évaluation de l'efficacité de l'approche. En revanche, les 4 autres animaux n'auront pas à être euthanasiés à la fin de l'étude car les informations histologiques nécessaires seront déjà obtenues à partir des deux premiers animaux. Ces animaux pourront donc être employés de nouveau à des fins scientifiques, puisque aucun effet néfaste persistant et permanent n'est attendu. En effet, l'approche expérimentale utilisée permet une réversibilité des comportements induits (donc transitoires), et participe entièrement au principe de raffinement. Les animaux seront leur propre témoin (mesure avant/après manipulation), ce qui permet de limiter le nombre d'animaux. Ainsi, le raffinement de nos investigations également lie à l'utilisation de l'imagerie cérébrale pour localiser les régions étudiées, la réversibilité des effets comportementaux, permet de réduire le nombre d'animaux et de prendre en compte leur bien être durant la phase expérimentale.

**9392** Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux

pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Par an, jusqu'à 70 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs, petits ruminants et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sur litière sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Par ailleurs, les petits ruminants sont hébergés en extérieur en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (jouets pour les porcins, chainette et bâton à ronger pour les lagomorphes et bâton à ronger pour les rongeurs) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

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

**9393** Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Par an, jusqu'à 612 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs, petits ruminants et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Par ailleurs, les petits ruminants sont hébergés en extérieur en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâtons à ronger pour

les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens et chainette + bâton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et une structure du bien être animal, intégrant plusieurs vétérinaires, travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

**9394** L'ingénierie tissulaire est l'ensemble des techniques faisant appel aux principes et aux méthodes des sciences de la vie et des sciences des matériaux. Cette science permet de comprendre les relations entre les structures et les fonctions des tissus normaux et pathologiques des mammifères, afin de développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus.

Les techniques d'ingénierie tissulaire sont en pleine expansion et offrent des alternatives potentielles pour la reconstruction tissulaire.

Les "scaffolds" sont des matrices qui agissent comme des supports temporaires pour la fixation et la prolifération des cellules. Il existe déjà des scaffolds commercialisés pour la cicatrisation tissulaire, par exemple pour le tissu osseux ou le tissu cutané. Ces derniers sont synthétiques. La qualité de la formation des néo-tissus dépend fortement du matériau utilisé pour créer le scaffold.

Une équipe développe des scaffolds à base de substances naturelles comme l'Aloe Vera et la canne à sucre. Les études *in vitro* montrent une absence de toxicité et une excellente biocompatibilité, ainsi que des propriétés mécaniques non altérées. Cependant, les tests n'ont jamais été réalisés sur un organisme vivant dans son ensemble, mais uniquement dans des conditions contrôlées *in vitro*.

Le projet que nous présentons concerne la dernière étape des études de biocompatibilité : les études *in vivo*.

L'objectif de notre projet est d'étudier la biocompatibilité *in vivo* de plusieurs scaffolds dont la composition est issue de la biodiversité du Sud-Ouest de l'Océan Indien. Nous cherchons à caractériser et évaluer le tissu sous cutané en contact avec les scaffolds d'une part, mais également les propriétés physiques et chimiques des scaffolds après leur implantation dans un organisme vivant pendant des durées allant d'une semaine à deux mois. Pour cela, les scaffolds seront greffés en sous cutanée sur le dos de rats Wistar adultes. A l'issue, des analyses seront effectuées sur les scaffolds (observation au microscope électronique à balayage pour évaluer la dégradation des nanofibres, la colonisation et l'agencement des cellules dans le scaffold, analyses des propriétés physiques d'élasticité, porosité) et des analyses sur les tissus environnants les scaffolds : histologie et analyses anatomopathologiques (évaluation de la nécrose, de la fibrose, de la modification structurale des tissus sous cutanées) ainsi que immunohistochimiques (antiCD31 et PECAM1 pour évaluer l'angiogenèse, antiCD45 pour évaluer l'inflammation, anti- $\alpha$ -actin pour évaluer l'activation de certains types cellulaires).

13 nouveaux scaffolds différents par leurs compositions physico-chimiques seront comparés à 7 scaffolds contrôles déjà commercialisés. Au total, 20 scaffolds seront utilisés dans ce projet. Nous évaluerons la biocompatibilité des scaffolds sur 4 temps différents après leurs implantations dans le tissu sous cutané : 1 semaine, 2 semaines, 1 mois (4 semaines) et 2 mois (8 semaines). Afin d'obtenir des résultats exploitables statistiquement, nous avons besoin de  $n=5$  par condition.

Cette étude étudiera  $20 \times 4 = 80$  conditions différentes (20 scaffolds et 4 temps). Nous répétons 5 fois chaque condition, nous avons besoin d'un total de  $5 \times 80 = 400$  échantillons de scaffold en sous cutané. Nous pouvons étudier 4 scaffolds par rat, nous avons donc besoin de 100 rats Wistar pour notre étude.

Remplacement : cette étude correspond à la dernière étape des études de biocompatibilité, qui nécessite des organismes vivants dans leur ensemble afin d'évaluer les interactions entre les scaffolds et les tissus environnants. Aucun modèle cellulaire permet de reconstituer la complexité physiologique d'un organisme vivant (réponse immunitaire, métabolisme, processus de cicatrisation.). Nous sommes obligés d'utiliser des animaux vivants pour cette étape.

Réduction : afin de réduire le nombre d'animaux, nous avons choisis d'utiliser les rats (plus grand que les souris) et de greffer 4 scaffolds par rat. Il s'agit d'une greffe sous cutanée simple et petite : un échantillon de 0.5 cm sera placé sous la peau après avoir effectué une incision de la même taille. Nous pouvons aisément placer 4 échantillons sur le dos d'un rat sans avoir de gêne liée à la proximité. Ainsi nous diminuons par 4 le nombre total de rats utilisés.

Raffinement : les scaffolds seront stérilisés avant leur implantation sous cutanée. La procédure chirurgicale sera effectuée sous anesthésie. Une couverture analgésique avec de la buprénorphine sera assurée avant le début de l'acte chirurgical, et jusqu'à 24h après. Une surveillance quotidienne sera réalisée sur l'état général des rats, et une attention particulière sera faite sur les plaies chirurgicales pour prévenir tout rejet. Si un animal atteint un point limite (rougeur et gonflement d'une plaie chirurgicale pendant plus de 24h, point de nécrose sur une plaie chirurgicale, perte de poids de plus de 20%, prostration de plus de 24h), il sera retiré de l'étude.

**9395** Le système immunitaire a un rôle prépondérant dans l'élimination des cellules cancéreuses mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral. Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en évidence l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les NK et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer.

Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les thérapies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD-1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles pré-cliniques murins. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répondent à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques.

Dans ce projet, nous proposons de tester in vivo de nouvelles thérapies combinatoires ciblant le récepteur inhibiteur PD-1 et de nouvelles molécules du système immunitaire dans le but d'induire une réponse T anti-tumorale efficace et durable. Nous avons généré de nouveaux formats d'anticorps dit « bispécifiques » capables d'interagir avec 2 molécules en même temps, nous supposons que ce format améliorera l'effet de la monothérapie anti-PD-1. Cette étude in vivo est indispensable pour comprendre l'effet biologique de nos traitements et pour démontrer leurs efficacités thérapeutiques avant le lancement d'essai clinique.

Pour ce projet de 5 ans, le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 3240 souris (réparties dans 6 modèles tumoraux différents, selon 4 axes par modèle, et 3 à 6 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Dans le but de respecter le principe des 3R « Réduction, Remplacement, Raffinement », le nombre d'animaux par groupe a été calculé pour limiter la quantité d'animaux utilisés tout en conservant un nombre suffisant pour une évaluation statistique fiable. De plus, le nombre de 3240 souris est une estimation haute qui sera potentiellement réduit en fonction des effets thérapeutiques obtenus en Axe 1 et 2. Pour le « Remplacement », tous les traitements ont été préalablement testés in vitro. Les modèles tumoraux chez la souris nous permettent de valider l'effet thérapeutique de nos traitements ainsi que d'évaluer leur potentiel effet toxique avant d'envisager un essai clinique. Pour le « raffinement », le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Nous avons aussi mis en place une procédure non invasive pour visualiser par imagerie de bioluminescence la croissance de la tumeur. Cette technique nous permet d'exploiter au mieux les résultats et ce, sans souffrance pour l'animal.

**9396** L'imagerie nucléaire dont la tomographie par émission de positons (TEP) est un outil largement utilisé en recherche et en clinique car cette imagerie est réalisée à l'aide de sondes moléculaires spécifiques et suffisamment sensibles pour détecter des processus biologiques à très faible dose. Dans cette optique, les composés développés et testés dans ces études (64 Cu-6038 et analogues) représentent une nouvelle génération de dérivés de bactériochlorophylle contenant un pentapeptide cRGD qui permettent l'imagerie et le traitement de tumeurs solides avec le même composé. Ces composés restent piégés dans la tumeur pendant plus de 5 jours tout en étant éliminé rapidement de la circulation sanguine. La molécule initiale non couplée au Cu64 a montré une accumulation spécifique dans plusieurs modèles tumoraux chez l'animal et est détectable en imagerie par fluorescence. Le but de ces études est de démontrer l'efficacité de la molécule 64 Cu-6038 et de ses dérivés à se fixer sur la tumeur primaire et les métastases osseuses induits par différents types cellulaires chez la souris immunodéficiente lors d'études in vivo longitudinales en imagerie  $\mu$ TEP/ $\mu$ TDMX. Les modèles utilisés sont ceux de l'injection en sous-cutané, intra-cardiaque et intra-tibial de cellules cancéreuses 4T1, et MDA-MB-231 chez la souris femelle adulte et PC3 chez la souris mâle adulte. Les souris seront imagées avec la molécule d'intérêt de 1 à 4 semaines jours après induction de la tumeur. Plusieurs séances d'imagerie seront effectuées à plusieurs temps post injection.

La règle des 3 R sera respectée dans cette étude.

Raffinement : Les animaux seront placés à plusieurs par cage et leur environnement enrichi avec des tubes en PVC. De plus, les animaux, l'induction et la croissance des tumeurs au niveau du flanc des animaux seront quotidiennement surveillés et mesurés à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc). Les souris seront prises en charge selon le score obtenu avec euthanasie si atteinte des points limites terminaux (par exemple perte de poids limite, de mobilité ou dépassement du volume tumoral limite). Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées.

Réduction : nous utiliserons au maximum 1125 souris sur 5 ans (20 souris injectées avec les cellules cancéreuses et 5 souris injectées avec du PBS (témoins) par molécule (5 molécules au maximum seront synthétisées et testées), 9 modèles différents), ce qui permettra de réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus (test de Mann Whitney).

Remplacement : des tests in vitro préalables ont été réalisés mais l'objectif de ce travail étant de montrer la fixation de la molécule 64 Cu-6038 dans les cellules cancéreuses chez la souris, elle ne peut se faire que sur des animaux.

**9397** A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques préconisent d'avoir recours à la simulation dans l'enseignement initial de la chirurgie auprès des internes, et définitivement éviter toute première fois chez le patient, nous organisons des travaux pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage sur modèle animal validé.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte (ou laparotomie) et par cœlioscopie (ou laparoscopie), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale des internes, mais également en tant que formation continue pour des chirurgiens en exercice. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants IBODE, infirmières d'endoscopie, chirurgiens ou gastroentérologues seniors) et se développent de façon progressive dans différents laboratoires.

La formation s'effectue de façon progressive et intégrée au sein de :

1) le laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer, simulateur robotique Da Vinci) ou d'endoscopie, et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) le laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens et/ou des gastroentérologues sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.



Le projet développé ici est un projet de formation en par palier en chirurgie viscérale, sur modèle porcin. Ce modèle est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes praticiens/ chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie en laparoscopie.

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 120 animaux pendant 5 ans. De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation. Une grille standardisée d'évaluation des acquis des apprenants servira de référence pour justifier du nombre nécessaire de séances de formation, comprenant x procédures, pour acquérir les compétences par chaque individu et définir le nombre minimum d'animaux nécessaires à chaque formation.

Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

**9398** Des études menées chez l'animal ou chez l'homme ont révélé qu'une hormone produite par l'estomac, la ghréline, ou son récepteur, le GHSR, pourraient participer aux mécanismes mis en jeu dans le cerveau dans les processus addictions à l'alcool ou aux drogues. Cependant, un obstacle au développement d'approches thérapeutiques pertinentes est que les modèles animaux développés jusqu'à présent ne permettent pas de refléter la complexité de ce système hormonal. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles (modélisation, études in vitro) sont insuffisantes. Dans ce projet, nous proposons d'utiliser une lignée de rats mutants chez qui une mutation dans le gène GHSR rend les animaux hypersensibles à la ghréline.

Sur la base du mécanisme d'action de cette mutation et sur les avantages du modèle rat pour modéliser des pathologies psychiatriques humaines, nous proposons d'utiliser ce modèle dans le but de mieux comprendre le rôle de cette hormone sur la consommation de substances d'addiction et les signes de manque.

Le présent projet se focalise sur la récompense, la mémoire ou l'addiction en comparant les rats exprimant un récepteur ghréline muté aux rats non mutés selon les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Tester la vulnérabilité à l'addiction et à la rechute chez les animaux rendus dépendants à des substances d'addiction (cocaïne, morphine, héroïne).
- 2) Evaluer la réponse des animaux à différents types de récompenses non-addictives ou addictives : la nourriture sucrée, l'exercice physique (mesuré en roue d'activité) l'alcool, la cocaïne, la morphine ou l'héroïne.
- 3) Evaluer les capacités mnésiques chez ces animaux.

Pour cela, 5 types d'expériences seront réalisées sur des cohortes distinctes d'animaux libres de leurs mouvements explorant leur comportement spontané ou bien leur réponse à des substances injectées. Le nombre total de rats nécessaire à la réalisation de ce projet est de 731 pour une durée de 5 ans.

Pour réduire le nombre d'animaux et tenir compte de la règle des 3R, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Même si la totalité des expériences sont réalisées chez l'animal vigile, deux procédures chirurgicales seront nécessaires pour appareiller certains groupes d'animaux et permettre, lorsque ceux-ci auront récupéré de la procédure chirurgicale, d'administrer ou de mesurer des paramètres sans perturber le comportement de l'animal.

Ce projet met en jeu des procédures chirurgicales effectuées sous anesthésie générale, l'administration de substances à action psychotrope, des prélèvements sanguins et des tests comportementaux. En conséquence, toute douleur, souffrance, angoisse ou stress qui pourraient être

observés seront soulagés à n'importe quelle étape de la procédure. L'évaluation de la douleur chez l'animal sera réalisée de façon journalière par la technique du point limite. Tout animal chez lequel des critères de douleur seront observés recevra des analgésiques. Des douleurs sévères selon la grille d'évaluation entraîneront l'euthanasie anticipée de l'animal.

En résumé, grâce à ce modèle animal unique, ce projet permettra de tester sélectivement le rôle du récepteur ghréline dans la vulnérabilité à l'addiction et à la rechute et ainsi de prédire son potentiel thérapeutique chez l'homme.

**9399** Les synucléinopathies est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP). La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine  $\alpha$ -synucléine sous une forme aberrante dans les cellules du système nerveux central. L'accumulation de l' $\alpha$ -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies. Parmi ces maladies, la MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente et ne possède à ce jour aucun traitement curatif. Elle est caractérisée par la perte extensive des neurones dopaminergiques et l'accumulation de l' $\alpha$ -synucléine au sein d'inclusions cytoplasmiques neuronales appelées corps de Lewy, qui se propagent le long du système nerveux à mesure que la maladie progresse. Les symptômes sont caractérisés par des problèmes locomoteurs très lourds mais également non moteurs. Développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de cette maladie chez les patients est un enjeu de santé publique majeur aujourd'hui. Les preuves croissantes du rôle de l' $\alpha$ -synucléine dans la MP ont conduit à chercher des pistes thérapeutiques pour réduire la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine. Il a été démontré in vitro que la protéine  $\alpha$ -synucléine possède la capacité naturelle de s'agréger en forme anormale. Par conséquent, étudier des molécules qui permettent d'empêcher cette agrégation pourraient ouvrir des nouvelles pistes thérapeutiques. De telles molécules testées dans les phénomènes d'agrégation des amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer ont permis de perturber leur assemblage toxique. Nous émettons l'hypothèse qu'un mécanisme similaire devrait inhiber la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine.

Notre objectif est donc de s'appuyer sur les modèles expérimentaux uniques de la MP pour tester si la molécule CLR01 pourrait protéger les neurones contre la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine agrégée associée à la MP. En effet, cette molécule est capable de se lier à un acide aminé composant les protéines, la Lysine, rivalisant ainsi avec des protéines endogènes qui se lient à la Lysine pour former des agrégats toxiques.

Notre stratégie expérimentale est donc d'injecter par une chirurgie stéréotaxique chez des souris des corps de Lewy, ou leur contrôle pour reproduire la synucléinopathie observée chez l'Homme. Tout de suite après ou après 3 mois, une mini pompe osmotique sera posée en sous cutanée afin d'obtenir une libération progressive et continue de la molécule testée ou de son contrôle. Le cerveau des animaux sera ensuite prélevés pour une analyse histologique des effets de cette molécule sur les accumulations de Synucléine anormale.

Pour se faire, 60 souris C57Bl6/J divisées en 6 groupes de 10 seront utilisées pour tester cette hypothèse. Pour le R de réduire, ce nombre a été établi pour obtenir une puissance statistique suffisante lors de l'étude afin de démontrer un réel effet neuroprotecteur induit par le CLR01 dans ce modèle murin. Nous utiliserons une proportion égale de mâles et femelles.

Dans le respect du R de remplacer, dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons pas nous passer d'animaux vivants, car il n'est pas possible de mimer le développement spatiotemporel de cette maladie dans des modèles in vitro.

Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques et la pose des mini pompes se feront sous anesthésie générale avec une

couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

**9400** Les troubles dépressifs majeurs (TDM) sont des troubles mentaux fréquents, qui ont un retentissement majeur en termes de handicap, de qualité de vie, d'augmentation de la morbidité et de la mortalité et de cout global pour la société. Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) sont les antidépresseurs les plus prescrits. Bien qu'efficaces, ces médicaments présentent un inconvénient : environ 30% des patients demeurent non répondeurs. Hormis le changement de classe d'antidépresseur qui ne permet pas de répondre à tous les cas de non réponse il n'existe que très peu d'alternatives : parmi elles l'électro-convulsivo-thérapie (ECT) est une technique de choix. Elle consiste en l'application de chocs électriques au niveau du crâne des patients sous anesthésie. Ceci vise à reproduire des crises d'épilepsie contrôlées, qui induisent un effet antidépresseur rapide. De manière surprenante, malgré l'efficacité démontrée de ce traitement, les mécanismes mis en jeu lors de tels traitements demeurent très peu étudiés.

L'objectif de ce travail est donc de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu par l'ECT dans le cas de la non-réponse au traitement aux antidépresseurs dans un modèle murin de dépression. Outre cette caractérisation, cette étude permettra aussi d'approcher les bases moléculaires inhérentes à la non réponse aux antidépresseurs classiques.

Le modèle murin de dépression qui sera utilisé a été récemment développé : le modèle CORT qui repose sur l'élévation des concentrations en glucocorticoïdes chez la souris. Ces souris traitées à la corticostérone dans l'eau de boisson pendant 4 semaines présentent l'avantage de présenter un phénotype comportemental de type anxio-dépressif qui peut être traité par un traitement aux antidépresseurs notamment les ISRS. Similairement aux observations cliniques, environ 30% des souris ne répondent pas au traitement aux ISRS.

L'effet des ECT sera alors évalué chez ces animaux non répondeurs. Les performances comportementales seront alors mises en regard des données protéomiques issues soit de prélèvements sanguins soit des tissus cérébraux prélevés à la fin de l'expérience. Avec le double objectif de la caractérisation moléculaire des ECT et de la non réponse aux antidépresseurs tant au niveau cérébral qu'au niveau périphérique.

L'évaluation de systèmes cérébraux impliqués dans des processus aussi complexes que les troubles de l'humeur requiert de l'expérimentation in vivo. Pour l'ensemble de ce projet, 365 animaux seront utilisés.

Ce nombre prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux, de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser in vitro ou in silico des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier cette pathologie. L'ensemble du projet aura à cœur de conserver les animaux dans un état de confort optimal et pour ce faire des anesthésiques seront utilisés dès que nécessaire. Notre expérience se basera sur des mesures multiples : comportementales et biochimiques ou chaque animal bénéficiera d'un suivi individuel. Ceci présente l'avantage de générer une quantité de données importante pour chaque animal, et à en limiter ainsi le nombre.

Ce projet permettra non seulement de mieux comprendre les mécanismes d'action des ECT, mais aussi de proposer de nouveaux outils thérapeutiques pour anticiper la non réponse aux antidépresseurs et ainsi traiter au mieux les patients dépressifs souvent en grande souffrance.

**9401** Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique. Il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides, des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le

système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou engendrant une structure épitopique conformationnelle. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte cloné, puis copié en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par Cesar Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenu le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 500 souris.

La période minimum d'immunisation des souris est de 40 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9402** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La poule est notamment utile pour la production d'AcP contre des protéines de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. L'emploi de poule peut être considéré comme un raffinement de la production d'AcP, car ces derniers peuvent être extraits du jaune d'œuf sans avoir forcément à prélever du sang sur l'animal. De plus, l'utilisation de poules contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces dernières produisant de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire. De manière générale, les poules sont d'excellente productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poules ne conviennent pas à toutes les applications. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 poules.

Le temps minimum d'immunisation est de 63 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 14 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles

d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (coquille d'huitre, pommes).

**9403** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La poule est notamment utile pour la production d'AcP contre des protéines ou des peptides de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. Le choix de poule peut être considéré comme un raffinement de la production d'AcP, car ces derniers peuvent être extraits du jaune d'œuf sans avoir à prélever du sang sur l'animal. De plus, l'utilisation de poules contribue également à la réduction du nombre d'animaux utilisés, ces dernières produisant de plus grandes quantités d'anticorps que les rongeurs de laboratoire. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères. Il faut cependant souligner que les poules ne conviennent pas à toutes les applications. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 poules.

Le temps minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de

14 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les poules disposent d'enrichissement (coquille d'huitre, pommes).

**9404** Parvenir à une acceptation du greffon à long terme, sans traitement immunosuppresseur, et sans rejet chronique, constitue un but majeur, mais encore inaccessible en transplantation d'organe en clinique. Le foie est un organe au statut immunologique particulier. Cela se traduit en clinique par une fréquence élevée de tolérance spontanée après allotransplantation, puisqu'environ 20% des patients transplantés tolèrent un greffon hépatique après arrêt de leur traitement immunosuppresseur, mais aussi au niveau préclinique, par une capacité à induire une tolérance au produit d'un transgène exprimé dans le foie, après transduction par des vecteurs de thérapie génique.

Notre but est d'étudier les mécanismes impliqués dans ces processus de tolérance et d'en tirer profit afin de développer des outils de prédiction et d'induction de tolérance applicables à l'allogreffe de foie et d'îlots pancréatiques. Le modèle de greffes d'organes est un modèle pertinent permettant d'étudier la tolérance en allotransplantation. Le but de ce projet est d'évaluer si un protocole de thérapie génique consistant à exprimer spécifiquement dans le foie de souris receveuses, des alloantigènes de souris donneuses permet d'induire une tolérance immunologique à une greffe allogénique. Les mécanismes immunologiques impliqués seront identifiés et analysés.

Dans l'état actuel des connaissances, seul le modèle animal permet d'évaluer l'effet d'un traitement sur la survie d'un greffon dans des conditions physiologiques donc la souris ne peut pas être remplacée par des tests in-vitro. Néanmoins notre projet comprendra des méthodes complémentaires d'analyse des interactions des cellules immunitaires en condition in-vitro issues des animaux greffés. Le nombre d'animaux utilisé sera de 540 afin de rester dans une optique de réduction du nombre tout en gardant un effectif avec une pertinence statistique. Conformément aux règles des 3R, nous suivrons une approche coût/bénéfices en évaluant les probables effets douloureux et stressants observés sur les animaux utilisés par rapports aux bénéfices attendus de notre projet. Notre projet s'appuie sur un modèle d'induction du diabète qui est peu délétère pour l'animale ce qui a conditionné notre choix. Dans le cadre d'un effort continu de raffinement des procédures de mise en place du diabète et de la greffe îlots, nous définirons des points limites prédictifs pour pallier toutes douleurs ou détresses inutiles.

**9405** Les Salmonelles sont des bactéries responsables de problèmes de santé publique aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en développement. Des intoxications alimentaires surviennent avec la consommation de produits d'origine aviaire contaminés par Salmonella Enteritidis, en raison de l'infection chronique de volailles par cette bactérie. L'un des moyens de lutte contre cette infection serait la sélection génétique d'oiseaux plus résistants à la bactérie. Pour contribuer à l'avancement de cette recherche, nous allons identifier des gènes de résistance au portage chronique de la bactérie chez la Souris.

Le recours à des études sur l'animal est ici indispensable car les mécanismes étudiés se développent dans l'organisme entier (circulation de la bactérie dans le sang, activation du système immunitaire, prolifération de la bactérie dans certains organes, élimination par les cellules du système immunitaire, etc...). La Souris a montré sa pertinence en permettant d'identifier des gènes de résistance à une autre Salmonelle, dont l'importance a été ensuite confirmée dans d'autres espèces, dont l'Homme.

Nous disposons de collections de lignées de souris particulièrement adaptées pour faire ces études génétiques, et cette espèce permet de faire des croisements et possède les outils génétiques nécessaires pour atteindre l'objectif du projet.

Différents groupes de souris, de composition génétique différente, seront successivement infectés par voie intraveineuse selon un protocole expérimental bien établi et qui induit une infection sans symptômes dommageables pour l'animal. A différents temps après l'infection (3 et 6 semaines), les animaux seront euthanasiés et les organes récupérés pour mesurer le nombre résiduel de bactéries. La même procédure, de gravité légère, sera mise en œuvre sur un maximum de 2700 souris sur les 5 années du projet. Le nombre exact d'animaux sera ajusté en fonction des résultats de l'analyse

génétique. Bien qu'aucune altération de l'état de santé des animaux ne soit attendue avec ce protocole, les animaux seront surveillés très fréquemment pour détecter toute altération du bien être des animaux.

Les gènes ainsi identifiés pourront être testés dans des lignées de poulet et, si leur rôle est confirmé, servir à sélectionner des races plus résistantes.

**9406** Le diabète se traduit par une élévation de la glycémie qui peut entraîner des complications d'ordre vasculaires et nerveuses. L'association de ces complications crée un contexte favorable à une lésion des pieds. Cela représente la première cause d'amputation du membre inférieur, et est associée à des coûts importants.

La cicatrisation des plaies diabétiques met en jeu des mécanismes cellulaires complexes. L'oxygénation tissulaire est un marqueur perfusion microvasculaire locale et joue aussi un rôle clé dans la cicatrisation.

Le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) est une pathologie multifactorielle caractérisée par la présence d'épisodes d'hypoxie intermittente (HI) nocturne. Le SAS est associé à de nombreuses pathologies cardiovasculaires, telles que l'hypertension artérielle systémique, l'insuffisance coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, mais aussi à des troubles métaboliques, notamment une insulino-résistance et un diabète de type 2. L'atteinte microcirculatoire et le défaut de perfusion tissulaire qui en découle pourrait être un socle commun à ces complications. Plus spécifiquement dans le diabète de type 2, la fréquence du SAS est très élevée, estimée entre 58 et 86%.

L'objectif de ce projet est d'observer l'impact de l'hypoxie intermittent (modèle se rapprochant de la physiopathologie du SAS) sur la cicatrisation d'ulcère sur un modèle murin diabétique afin de déterminer un effet bénéfique possible de traiter le SAS de patient diabétiques afin d'améliorer la cicatrisation de leurs ulcères. En effet, des données récentes ont montré qu'un environnement appauvri en oxygène ralentissait la cicatrisation chez la souris diabétique. Nous émettons l'hypothèse que des souris diabétiques exposées à l'hypoxie intermittente (modèle animal du SAS), présentent également un retard de cicatrisation.

Durant cette étude, nous utiliserons 74 souris diabétiques (souche BKS, afin d'évaluer la cicatrisation sur 2 modèles d'ulcères : un ischémique (représentatif des escarres) et un par excision (blessure plus conventionnelle). Ce nombre a été calculé en respect des règles d'éthiques en expérimentation animale limitant le nombre et l'impact du protocole sur chaque animal suivant la règle des 3 R (Réduire : calcul du nombre minimal d'animaux nécessaires pour conclure statistiquement sur les résultats. Nous avons opté pour une réduction du nombre d'animaux utilisés par 2 en réalisant 2 ulcères par animal / Raffiner : utilisation d'antalgiques pour la réalisation des ischémies, d'une tapis chauffant pour la thermorégulation des animaux pendant l'anesthésie et hébergement dans les conditions réglementaires/ Remplacer : nous ne pouvons remplacer l'animal par un modèle informatique ou cellulaire dû à l'importance des interactions systémiques en jeu dans la cicatrisation et ces modèles spécifiques). Les animaux seront exposés à un stimulus hypoxique (ou normoxique pour le groupe contrôle) tout au long de la cicatrisation des ulcères. Nous espérons, par cette étude, déterminer l'intérêt d'un traitement possible par Pression Positive Continue (PPC), traitement de référence du SAS, de patients diabétiques dans le but d'améliorer la cicatrisation d'un ulcère.

**9407** Notre laboratoire étudie les facteurs moléculaires qui prédisposent à des malformations congénitales de la peau et du cœur présentes dès la naissance, mais qui peuvent se manifester cliniquement tout au long de la vie. Ces deux organes partagent l'utilisation de voies de signalisation et également l'intégration de certaines populations cellulaires communes pour se construire pendant la vie in utero et périnatale.

Nous croiserons des modèles choisis de souris de laboratoire (*Mus musculus*) génétiquement modifiées pour porter des variants de séquence de plusieurs gènes impliqués ensemble dans les pathologies liées aux défauts de développement des valves, de la voie efférente du cœur, des vaisseaux sanguins ou, curieusement, des cellules pigmentaires. Ces variants ont des conséquences fonctionnelles sur l'activité des protéines produits par ces gènes chez la souris comme chez l'humain. Leur activation constitutive est retrouvée dans de nombreux cancers chez l'humain. Quand elles



surviennent in utero, elles ne donnent pas de cancers mais plutôt des malformations des systèmes cardiovasculaires, nerveux et cutanés, avec parfois une prédisposition à une croissance tissulaire incontrôlée. Le but des croisements est de cibler non seulement les tissus, mais également le moment, de la survenue des mutations en cours d'étude. Ce projet a déjà été initié il y a quelques années avec des résultats prometteurs qui pointent une fenêtre temporelle plus étroite de survenue de mutation et la population cellulaire à viser in utero. Ces connaissances nous permettront de développer et caractériser des nouveaux modèles de maladies rares humaines qui pourront rendre possible des études précliniques ultérieures : le syndrome de naevus géant congénital, les malformations artérioveineuses et certaines malformations congénitales de la voie efférente du cœur. Afin d'identifier des mécanismes propices à des interventions thérapeutiques chez les personnes atteintes des malformations congénitales portant des mutations dans ces voies de signalisation, notre étude prévoit des expériences complémentaires. Elle portera sur un maximum de 5.500 souris, avec un raffinement progressif des croisements par sélection de souris portant plusieurs allèles compatibles.

Pendant la durée du projet, les souris seront stabulées par groupe de 2 à 5 dans des cages dont l'environnement sera enrichi à l'aide de maisonnettes en carton et elles auront un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Pour l'ensemble des procédures réalisées, des dispositions permettant de réduire la douleur ou le stress des animaux. Les traitements seront administrés selon les normes de bonne pratique vétérinaire, en respectant les préconisations sur les volumes et aiguilles utilisées. Bien qu'étant indolores, les études d'imagerie médicale seront réalisées sous anesthésie générale afin de limiter le stress des animaux.

Nous avons prévu la réutilisation des embryons ou souris ne portant pas les allèles désirés pour étudier en parallèle l'expression normale des gènes et de protéines dans les voies moléculaires d'intérêt à ces mêmes stades de développement, que ce soit pendant ou après la gestation. Ces approches permettront de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Un nombre minimal d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique en tenant compte toutefois de la variabilité inter-individuelle. Enfin, quand c'est possible, notre approche expérimentale intègre également des études organotypiques et cellulaires in vitro, ce qui permet parfois de remplacer les animaux dans l'élaboration des hypothèses au fil du temps. Il n'existe cependant aucune méthode substitutive qui pourrait remplacer ce protocole sur animaux vivants, car nos études doivent se faire dans le contexte de l'organisme entier au cours du temps pendant l'embryogenèse et vie fœtale.

**9408** La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) représente la 4ème cause de mortalité dans le monde. C'est un groupe de maladies chroniques systémiques d'origine respiratoire, atteignant les bronches. Cette maladie est due à l'agression des bronches par des facteurs environnementaux comme la fumée de cigarette ou les polluants atmosphériques. Les lésions pulmonaires associées à la pathologie sont relativement bien connues avec notamment l'emphysème pulmonaire caractérisée par la destruction de la paroi des alvéoles (site des échanges air/sang) amenant à une insuffisance respiratoire parfois mortelle.

On soupçonne que l'inflammation chronique des poumons entraîne les dysfonctionnements sur d'autres organes : muscles, vaisseaux sanguins et cœur. L'atteinte cardiaque pourrait être due à l'hypertension pulmonaire. Dans de grandes cohortes de patient, il a été mis en évidence une corrélation entre des problèmes de remplissage cardiaque et l'étendue de la destruction emphysémateuse du poumon. Les mécanismes de cette relation et les bénéfices sur la fonction cardiaque et sur la pression artérielle pulmonaire de la réduction de l'emphysème ne sont pas connus. Le but du projet est donc de développer un modèle animal rat de BPCO pour étudier la relation entre emphysème pulmonaire et modifications cardiovasculaires. Un emphysème pulmonaire proche de celui observé chez l'homme sera créé par instillation dans les bronches d'une enzyme qui va léser les alvéoles pulmonaires. L'objectif est de recréer un modèle mimant les interactions cœur-poumons dans la BPCO, afin d'accéder à la séquence d'évènements notamment précoces et aux voies de signalisation cellulaires et moléculaires impliquées à chaque étape.

Interférer précocement avec de nouvelles cibles identifiées dans le processus de la maladie, pourrait permettre d'offrir de nouveaux débouchés thérapeutiques. Une évaluation rétrospective sera effectuée suite à la mise en place du modèle.

Notre étude sera menée sur des rats de 8 semaines, selon les recommandations institutionnelles en vigueur. Un total de 100 animaux sera utilisé pour ce projet

Pour la mise au point du modèle et suivi cardiovasculaire, un groupe de 10 rats recevra dans les poumons une solution d'élastase et sera comparé à un groupe de 10 animaux qui recevra une solution de liquide physiologique. Le reste des animaux sera utilisé pour le second objectif à savoir l'étude de la réversibilité des atteintes cardiovasculaires. Deux nouveaux traitements seront testés pour réduire les complications cardiaques et seront comparés à un groupe malade et un groupe control (20 animaux par groupe).

Les animaux seront hébergés en portoir ventilé, dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage, et des lanières de résineux tendre seront utilisés pour l'enrichissement. Des points limites seront établis dans chaque étude afin d'éviter ou limiter toute souffrance des animaux. Cette étude est un pré-requis à une future étude clinique chez l'Homme

Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous réduirons le nombre d'animaux via une approche rationnelle et organisée sur le plan des protocoles (acquisition de données in vivo et in vitro menées en parallèle sur les mêmes animaux permettant d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations). Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux euthanasiés. Nous réaliserons un maximum de mesures non invasives sur le même animal. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites. Des traitements antalgiques sont prévus pour réduire la souffrance animale.

**9409** Le bar européen *Dicentrarchus labrax* est une espèce de poisson marin d'intérêt aquacole en Europe. Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux scientifiques ont été menés afin d'améliorer les conditions d'élevages et optimiser la productivité des fermes de bar. A ce titre, une attention particulière a été portée aux apports alimentaires en huile et farine de poissons nécessaires pour couvrir les besoins en protéines, en lipides et plus particulièrement en acides gras à longues chaînes polyinsaturés (AGLPI) tel que l'acide eicosapentanoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA). Les lipides alimentaires sont une source essentielle en énergie tandis que les AGLPI sont des constituants membranaires de base. Les AGLPI interviennent également dans la modulation de nombreuses fonctions biologiques telle que la réponse immunitaire et le système cardio-vasculaire, et de ce fait le besoin en AGLPI peut dépendre des paramètres environnementaux. Une couverture nutritionnelle adéquate en AGLPI est indispensable pour le bar car il n'a pas les capacités d'en synthétiser.

Les farines et huiles de poissons étant devenues des matières premières onéreuses et limitées, des études ont été menées pour optimiser leurs ajouts dans les formulation d'aliments pour poissons d'élevage. Dans cette optique, l'utilisation d'huiles végétales comme substituts partiels des huiles de poissons dans l'alimentation des poissons est largement répandue mais pose problème car les huiles végétales sont dépourvues en AGLPI. La stratégie des fabricants d'aliments consiste donc à combiner huile végétale et huile de poisson dans l'aliment (i) pour couvrir les besoins énergétiques du bar (tout en évitant l'accumulation excessive de lipides au niveau hépatique), et (ii) pour couvrir les besoins nutritionnels et physiologiques en AGLPI.

Les formulations alimentaires actuelles permettent une croissance optimale du bar dans des conditions environnementales favorables et assez stables; ces formulations ne prennent pas suffisamment en compte les événements climatiques actuels, qui induisent en particulier de fortes variations de température et de la quantité de l'oxygène dissous dans l'eau, avec un effet cascade sur la physiologie des poissons élevés et leurs besoins nutritionnels. Ainsi les aliments commerciaux actuels, riches en lipides et limités en AGLPI, pourraient donc être inadaptés lorsque les conditions d'élevages deviennent défavorables. Notamment, une élévation importante de la température de l'eau associée aux fortes densités de poissons en cage conduit à une diminution importante de l'oxygène dissous dans l'eau au cours de la période estivale. Ces conditions défavorables conduisent

à une diminution de la prise alimentaire et un affaiblissement général du poisson, le rendant beaucoup plus vulnérable à la présence de pathogènes opportunistes présents dans l'environnement aquatique. Des mortalités importantes associées à la présence d'agents infectieux tel que Nodavirus sont régulièrement rapportées par les fermes d'élevage lors de ces événements climatiques. Une composition alimentaire optimale en lipides et AGLPI au regard de la santé du bar pourrait réduire la vulnérabilité du poisson lors de ces événements critiques et ainsi améliorer sa résistance globale, et vis-à-vis des pathogènes en particulier.

L'objectif principal de ce projet est donc de déterminer les compositions alimentaires optimales en lipides et AGLPI en termes de croissance ET santé chez le bar.

Dans le cadre de ce projet, 6 aliments, couvrant les besoins nutritionnels (tels que connus en situation standard) mais se distinguant par des compositions différentes en lipides et AGLPI, seront distribués à des juvéniles de bar élevés dans des conditions optimales (densité, température, oxygène) pendant 2 mois (période de normoxie). Par la suite, ces poissons seront soumis à une hypoxie modérée pendant un mois (40-50% de saturation en oxygène), mimant ainsi les conditions défavorables pouvant être observées en cage en mer lors des périodes estivales. Cette phase expérimentale débutera avec 400 poissons par régime, soit un total de 2400 poissons (6 régimes). Pour chaque régime, 20 poissons seront prélevés en fin de normoxie et d'hypoxie modérée (2 prélèvements de 20 poissons) pour les analyses biologiques (marqueurs de fonctions physiologiques). En fin de période d'hypoxie modérée, un sous-groupe de 80 individus sera soumis à un test d'effort non léthal, afin d'évaluer leur tolérance à l'hypoxie aiguë en fonction du conditionnement alimentaire. Les données de croissance ainsi que les données physiologiques et de tolérance obtenues permettront de déterminer quelle composition alimentaire en lipides et AGLPI est plus adaptée aux conditions d'élevage défavorables testées (ici, l'hypoxie).

Dans le cadre d'une expérience complémentaire faisant l'objet d'une évaluation auprès d'une autre commission éthique, 250 poissons par régime alimentaire seront transférés dans une autre structure expérimentale habilitée pour réaliser des expositions au Nodavirus (un pathogène auquel sont couramment exposés les bars).

Notre étude répond aux critères des 3R :

**Remplacement :** Dans le cadre d'une étude translationnelle destinée à caractériser le résultat d'interactions complexes entre différents tissus et fonctions, il n'est pas possible de faire appel à des méthodes de remplacement. En effet, la réponse au stress hypoxique implique différents processus biologiques associés à différents organes (branchies, cœur, foie) ce qui nécessite l'utilisation d'organismes vivants afin d'intégrer dans l'étude toutes les composantes physiologiques.

**Réduction :** le nombre de poissons a été réduit au minimum et défini au seuil de la pertinence scientifique et statistique.

**Raffinement :** Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche).

**9410** Le cervelet est l'une des régions clés du cerveau impliquées dans la coordination motrice. Lors des dommages cérébelleux, les mouvements perdent de leur précision et deviennent variables, non coordonnés et mal synchronisés, tant chez les humains que chez les modèles animaux. On sait que le cervelet traite les informations sensori-motrices et induit des modifications immédiates des mouvements en cours. Les bases cellulaires d'une telle intégration demeurent largement inconnues. Le but de ce projet est d'examiner le fonctionnement normal et pathologique du réseau neuronal de la couche superficielle du cervelet et d'étudier comment ce réseau contrôle l'activité des cellules sous-jacentes chez la souris éveillée. Pour cela nous utilisons des souris transgéniques permettant de mesurer l'activité électrique des neurones par des techniques d'imagerie et par enregistrement électrophysiologique. Pour obtenir des connaissances plus approfondies, nous contrôlerons l'activité des neurones en utilisant une approche optogénétique dans une deuxième étape. Cela nous permettra d'établir de manière ciblée le rôle de ces neurones dans la locomotion. En effet, pour comprendre le rôle des neurones dans le comportement moteur il est indispensable d'analyser divers

paramètres du comportement et de l'activité des neurones en parallèle. Ceci est possible exclusivement chez un animal éveillé et autonome.

Un dispositif est fixé sur la tête de chaque animal permettant l'introduction intra-crânienne des sondes d'enregistrement et le maintien des animaux sous l'objectif du microscope tout en permettant leur mobilité. Toutes les chirurgies - fixation et craniotomie - sont effectuées sous anesthésie générale et des analgésiques sont administrés pré- et postopératoire. Les expérimentations ultérieures s'effectueront sur des souris éveillées qui marchent ou non sur une roue. Les souris auront tout d'abord une période d'adaptation à la marche sur roue, pour éliminer le stress.

Nous comptons utiliser 300 animaux en 5 ans. Nous utiliserons les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats exploitables à partir du plus petit nombre d'animaux possible. Les procédures seront optimisées afin de respecter les devoirs de Réduction et Raffinement. L'optimisation des soins aux animaux nous permettra d'utiliser certains animaux pour plusieurs sessions d'enregistrement et de réduire la durée de l'étude au minimum. La surveillance continue de l'animal permettra d'arrêter toute procédure expérimentale lorsque l'animal montre des signes d'anxiété ou de souffrance majeure.

**9411** Une plaie chronique est définie comme une plaie aiguë avec un retard de cicatrisation d'au moins 3 semaines. C'est le signe que les phases de cicatrisation ne s'enchaînent plus physiologiquement. Ce retard de cicatrisation engendre une diminution de la qualité de vie du patient, un risque d'infections, d'amputations et de sepsis. En France, le taux de prévalence des plaies chroniques est estimé à 1% de la population générale. Le diabète est une pathologie couramment associée aux plaies chroniques. D'après les données de l'assurance maladie, 44% d'une population de plus de 15 400 diabétiques, hospitalisées en 2010 pour une plaie du pied, ont été revus pour une nouvelle plaie et 20% sont décédés une année plus tard. Pour lutter contre la chronicité des plaies, les mécanismes physiologiques et les voies de signalisation responsables de la chronicité de ces plaies sont actuellement très étudiés.

Le graphène est un nanomatériau constitué de fibres de carbone. Flexible et conducteur, ses propriétés électriques, mécaniques, antimicrobiennes et biocompatibles en font un matériau intéressant dans le domaine biomédical. Depuis 2004, un nouveau procédé permet de créer des monocouches de graphène implantables sur des pansements. Dû à ses propriétés, le graphène pourrait favoriser la cicatrisation des plaies avec lesquelles le pansement est en contact lorsque le graphène est inerte ou lorsqu'il est parcouru par de faibles courants électriques (électrostimulation). La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris (63 animaux estimés sur 3 ans). Pour étudier les phases de cicatrisation, l'utilisation de méthodes alternatives ou substitutives n'est pas pertinente. Le modèle cellulaire ne permet pas d'appréhender toutes les modifications des différentes phases de cicatrisation inflammation, ré-épithélisation et formation du tissu de bourgeonnement. Nous avons organisé nos expériences pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (un seul groupe contrôle pour chaque modèle). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux (utilisation de méthodes non-invasives pour le suivi de la cicatrisation, insulinothérapie, régime alimentaire adapté et analgésie), et pour apprécier au mieux les points limites (perte de poids, posture anormale et hypoactivité).

**9412** Notre processus de production assure l'approvisionnement de matières premières critiques pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

La plupart des animaux de production ou d'élevage sont élevés en groupe (volailles, porcs, veaux, bovins ...). Pour cette raison, la médecine vétérinaire en élevage est une médecine de population et non d'individus. L'assainissement du cheptel se fait par détection de différentes maladies infectieuses dans les troupeaux, puis traitement des troupeaux infectés. Dans le cas des maladies infectieuses, les tests de diagnostic in vitro visent à détecter et à identifier l'agent infectieux responsable (bactérie, virus, parasite, champignon...). Ils sont essentiels pour déterminer le traitement adapté au troupeau. De plus, le diagnostic de certaines affections communes à l'homme et à l'animal, apporte son concours en matière de santé publique.

4 hybridomes ont été développés, sécrétant chacun, un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique de différentes pathologies infectieuses pouvant toucher le cheptel. Ces Mabs entrent dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisés par de nombreux laboratoires vétérinaires départementaux et à l'international.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ces 4 Mabs n'ont pu être caractérisés techniquement et validés que sur des lots issus de production en condition in vivo. Des essais très poussés ont été menés pour tenter le transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur). Les résultats concernant la capacité de ces clones à produire in vitro le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs concernés, démontrent la nécessité incontournable de poursuivre la production de ces Mabs en condition in vivo.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs exploitant ces Mab et en l'absence de solution alternative, imposent le maintien de la production de ces réactifs.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 100 par clone par cycle de production. Les souris participant à la totalité de ce protocole sont au nombre de 2000 (100 souris pour 4 clones sur 5 années).

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis de nombreuses années, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par une technique éthiquement acceptable (asphyxie par saturation progressive en CO<sub>2</sub>), soit par élongation cervicale.

**9413** Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des récepteurs de chimiokine. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre l'un des récepteurs à chimiokine. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter la protéine d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour sous exprimer cette molécule, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue dans ce modèle murin comme du « non-soi ». Le temps d'immunisation des souris sera d'environ 3 mois.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement

l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 40 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 40 souris (2 x20).

La période minimum d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation ne nécessitant pas l'ajout d'adjuvant est de degré de gravité légère.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9414** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer in situ comme

immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire. L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylé. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 100 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (20 x5 souris).

Le temps minimum d'immunisation est de 71 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une immunisation intramusculaire au niveau du muscle tibial antérieur sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9415** Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des cancers hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines » reflétant les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Afin d'améliorer le traitement de ces PTCL, il est important de développer des modèles permettant de mieux comprendre les mécanismes de transformation des lymphocytes T mais aussi les facteurs nécessaires à la survie des cellules lymphomateuses afin de mieux les cibler. Ces études devraient ainsi permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques de ces pathologies incurables à ce jour. Des travaux récents réalisés dans un modèle de souris révèlent que la transformation tumorale de ces lymphocytes T est induite par leur stimulation chronique. Afin d'améliorer le traitement de ces PTCL, nous souhaitons étudier dans les mécanismes responsables de la survie des cellules lymphomateuses après transformation et notamment le rôle de l'interaction entre les cellules lymphomateuses et leur microenvironnement.

De nombreuses données suggèrent que l'interaction entre le microenvironnement cellulaire et les cellules lymphomateuses fait intervenir des récepteurs associés à des cellules immunitaires appelées cellules Natural Killer et qui sont exprimés par les cellules tumorales.

Pour analyser les mécanismes impactant la survie cellulaire, nous utiliserons soit des inhibiteurs pharmacologiques afin d'inhiber la signalisation en aval de ces récepteurs, soit des anticorps bloquant l'activation de ces récepteurs.

Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant des études sur les facteurs de survie des PTCL et il est important de comprendre en particulier le rôle du microenvironnement tumoral dans ces mécanismes de survie des cellules lymphomateuses. Il nous faut donc développer de nouveaux modèles animaux permettant d'aborder ces différents aspects. Pour cela la souris est très utile car il existe des modèles génétiquement modifiés tels que les souris p53 KO permettant le développement plus rapide et une pénétrance plus importante de ces pathologies. Des points limites ont été définis. Ici nous allons procéder de façon séquentielle, ainsi la réalisation d'une procédure dépendra des résultats de la procédure précédente, de manière à réduire au maximum le nombre de souris impliquées dans le projet. Afin de réduire au maximum la douleur des animaux, ceux-ci seront observés trois fois par semaine au cours de l'expérimentation.

Au maximum 427 souris seront nécessaires pour ce projet.

**9416** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir de prise de sang suivie de l'isolement du sérum, puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.



Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 45 jours.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9417** Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologie tente d'évaluer l'activité tumorigène d'un couple chimiokine/ récepteur. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre l'un des couples chimiokine/ récepteur. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostique et thérapeutique).

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM (spécifique d'un déterminant antigénique/épitope) synthétisé par son lymphocyte parental. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre

d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (10 x 10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9418** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunomécanique. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature. Les souris immunisées, seront des animaux génétiquement modifiés pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique).

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique

ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, plusieurs souris seront nécessaires, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (10 x10).

Le temps minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9419** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunomécanomicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une alternance entre des immunisations classiques associant un antigène (protéine/ cellule/ peptide) à un adjuvant et des immunisations géniques, décrites pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer in situ comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate des poules immunisées, seront triés et séquencés afin de générer in vitro des anticorps monoclonaux recombinants. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre des structures protéiques particulières, une quantité de 40 poules sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention de lymphocytes B produisant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La poule est notamment utile pour la production d'Anticorps contre des protéines de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 40 poules (2 x20).

Le temps minimum d'immunisation est de 99 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée pour les immunisations classiques (antigène associé à un adjuvant) et légère pour les immunisations géniques (anesthésie + absence d'adjuvant). Les immunisations géniques seront réalisées, après anesthésie, via une injection intramusculaire au niveau du muscle tibial antérieur ou du muscle pectoral conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (grattoir, coquille d'huitre, pommes).

**9420** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés

linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 98 jours.

Dans la production d'AcP, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9421** Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (« OMS ») a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques. Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologie tente d'évaluer l'activité tumorigène d'un couple chimiokine/ récepteur. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse

immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre l'un des couples chimiokine/ récepteur. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêt à des souris, afin d'induire une réponse immunitaire.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM (spécifique d'un déterminant antigénique/épitope) synthétisé par son lymphocyte parental. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (10 x 10).

La durée minimale d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9422** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures

immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature.

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 50 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues. Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 souris (2 x 25).

Le temps minimum d'immunisation est de 85 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9423** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : remplacement de l'adjuvant complet de Freund).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 rats.

Le temps minimum d'immunisation est de 60 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9424** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.



Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer in situ comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire. L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B. L'approche envisagée consiste à immuniser à l'aide de plasmides codant les protéines d'intérêt, des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique).

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre des structures protéiques particulières, plusieurs souris seront nécessaires, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (10 x10).

Le temps minimum d'immunisation est de 71 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une immunisation intramusculaire au niveau du muscle tibial antérieur sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9425** Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des récepteurs de chimiokine. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ces acteurs présente donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre l'un des récepteurs à chimiokine. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter la protéine d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour sous exprimer cette molécule, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue dans ce modèle murin comme du « non-soi ». Le temps d'immunisation des souris sera d'environ 2 semaines.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 40 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 40 souris.

La période minimum d'immunisation des souris est de 13 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9426** Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des chimiokines. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ces acteurs présente donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre une chimiokine et l'un de ses récepteurs. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêts à des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostique et thérapeutique).

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 60 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 60 souris (6 x10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 13 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9427** Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature.

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylé. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 100 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 souris (20 x5).

Le temps minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9428** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 105 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9429** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant

une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 5 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 40 protocoles, représentant 200 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 83 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9430** Notre processus de production assure le développement d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes.

Cette diversité constitue une défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les

révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. Ce programme se base sur une approche originale d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, qui consiste à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'induire une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer in situ comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire. Des échantillons de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire). Lorsque le titre est suffisamment élevé, un antisérum est préparé en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis. Si nécessaire, une purification des anticorps est effectuée à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 80 protocoles, représentant 160 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé, l'injection se réalise en introduisant une aiguille dans le muscle du tibia conformément aux bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9431** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement



composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 10 protocoles, représentant 350 Lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 70 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, tablette...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9432** Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les hormones sexuelles, telles que la testostérone et l'œstradiol, circulent dans le sang liées à un transporteur. Seule une petite fraction de ces stéroïdes n'est pas liée et est par conséquent active et capable d'activer une cellule. La biodisponibilité des hormones sexuelles est ainsi directement corrélée au taux du transporteur.

L'ontogénie de ce transporteur chez l'être humain a été étudiée en détail. Les concentrations de SHBG varient en fonction de l'âge ; ses taux plasmatiques sont faibles à la naissance et augmentent de manière progressive chez l'enfant prépubère des deux sexes, pour atteindre des valeurs élevées, supérieures à celles retrouvées chez l'adulte. Cette molécule est un des acteurs majeurs du climat plutôt œstrogénique chez la femme et plutôt androgénique chez l'homme.

La complexité de la régulation de cette protéine et la multiplicité de ses facteurs de régulation expliquent les variations physiologiques et pathologiques de sa concentration plasmatique et les conséquences sur l'équilibre androgènes/œstrogènes. Des corrélations d'intérêt clinique ont pu être faites entre le niveau de ce transporteur circulant et un certain nombre de pathologies. Une diminution des concentrations plasmatiques de ce transporteur est observée au cours des états hyperinsuliniques. Chez la femme obèse, les concentrations de SHBG sont en général abaissées et, inversement, elles augmentent dans les situations de dénutrition telles que l'anorexie. Le taux de ce transporteur augmente en cas d'hyperthyroïdie pour revenir à la normale après traitement, aussi bien chez l'homme que chez la femme. Une concentration élevée est également corrélée à une hyperthyroïdie ou une cirrhose hépatique.

Un hybridome a été développé, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique de ce transporteur. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par de nombreux hôpitaux et laboratoires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé techniquement et validé cliniquement que sur des lots issus de production en condition in vivo. Des essais très poussés ont été menés pour tenter le transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur). L'ensemble des résultats concernant la capacité dudit clone à produire in vitro le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition in vivo.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 1000 par cycle de production.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis de nombreuses années, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée par une technique éthiquement acceptable soit via une asphyxie par saturation progressive en CO<sub>2</sub>, soit par élongation.

**9433** Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société sœur, leader mondial du diagnostic in vitro.

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire constituant le principal initiateur de la coagulation plasmatique. Le FT est exprimé constitutionnellement par les fibroblastes de la paroi vasculaire et par les cellules épithéliales, mais son expression est aussi inductible dans les monocytes, les cellules musculaires lisses ou les cellules endothéliales. Le FT est un récepteur pour les facteurs de la coagulation VII et VIIa. Il est responsable de l'auto-activation du FVII en FVIIa. La liaison du FT avec le facteur VII ou VIIa permet la formation du complexe FT-VIIa, qui par l'activation des facteurs IX et X, déclenche l'activation de la coagulation, aboutissant à la génération de thrombine et la formation de fibrine. En plus de son rôle dans l'hémostase normale, le complexe FT-VIIa est notamment impliqué dans la survenue de thromboses associées aux maladies malignes, aux syndromes coronaires aigus et aux sepsis sévères.

La régulation de l'activité du complexe FT-FVIIa, essentielle au maintien de l'équilibre hémostatique, est assurée par l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI). Cet inhibiteur (TFPI) inactive non pas le FT mais l'activité catalytique du complexe FT-facteur VIIa. Dans un premier temps, le TFPI se lie au facteur

Xa, le facteur Xa est alors inhibé ; dans un second temps, le complexe Xa/TFPI va se lier au complexe facteur VIIa-FT pour former un complexe quaternaire facteur Xa/TFPI/ facteurVIIa/ FT, au sein duquel le facteur Xa, le facteur VIIa et le FT n'ont plus d'activité. Le TFPI limite donc l'activation de la coagulation induite par l'expression du FT. De par son action sur le FT, le TFPI intervient également dans de nombreuses situations physiopathologiques. Il est de ce fait nécessaire de disposer d'une méthode de dosage permettant de suivre les variations de son activité non seulement dans des situations de risques thrombotiques mais également dans le suivi de l'évolution d'autres pathologies, notamment cancéreuses.

Dans ce cadre, notre société sœur a développé des outils de dosage du TFPI. Ces outils se basent notamment sur l'utilisation d'un hybridome développé, il y a une vingtaine d'années, sécrétant un anticorps monoclonal (AcM) capable de reconnaître et de bloquer ultra-spécifiquement le TFPI. Cet AcM a été validé initialement sur des lots issus de production en condition in vivo. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été réalisés pour un transfert de cette production en condition in vitro (bio-réacteur, ...). Dans le cadre d'investigations, une faible quantité d'anticorps produit in vivo servant de référence est nécessaire.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production in vivo par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 200 souris par an, sur 5 ans, soit 1000 souris. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par asphyxie par saturation progressive en CO<sub>2</sub>, soit par élongation.

**9434** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le cobaye est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une faible quantité en antigène est disponible, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. De plus, elle permet aux différentes équipes de recherche de disposer d'un outil complémentaire aux anticorps produits par d'autres espèces.

Le temps minimum d'immunisation est de 120 jours.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 150 cobayes.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine d'une semaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les cobayes sont hébergés en groupe dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9435** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leurs spécificités, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérum) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 180 protocoles, représentant 540 Lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 56 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9436** Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures

immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 250 souris.

Le temps d'immunisation des souris sera de 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation. Contrairement au protocole classique d'immunisation, dans ce programme aucun prélèvement d'échantillon sanguin ne sera effectué, permettant également de réduire la détresse.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9437** Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement

composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immun-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 250 souris.

Le temps d'immunisation des souris sera de 11 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation. Contrairement au protocole classique d'immunisation, dans ce programme aucun prélèvement d'échantillon sanguin ne sera effectué, permettant également de réduire la détresse.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9438** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 30 protocoles, représentant 300 rats.

Le temps minimum d'immunisation est de 35 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.



**9439** Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenu le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des rats, afin de permettre la production par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par ce modèle animal comme du « non-soi ».

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate des rats immunisés, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome rat, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

Même si les souris restent les animaux les plus couramment utilisés pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, les rats sont notamment intéressants pour l'obtention d'IgG spécifiques pour les protéines de souris (Garvey et al., *Methods in Immunology* 1997 ; Hanly et al., *ILAR Journal* 1995). Le rat est facile à manipuler et à élever en laboratoire. L'utilisation de rats permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 30 protocoles, représentant 90 rats.

Le temps d'immunisation des rats sera de 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque ni pour les utilisateurs ni pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré gravité légère à modérée en

fonction de l'adjuvant utilisé. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Au cours du processus d'immunisation, des échantillons de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire).

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9440** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 21 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9441** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La petite taille des souris constitue un obstacle à la collecte d'une quantité importante d'AcP. Cependant le modèle murin est particulièrement avantageux pour des projets nécessitant une faible quantité limitée d'anticorps ou pour lesquels la quantité d'antigène disponible est limitée à quelques microgrammes. De plus, les souris ont une bonne capacité à s'adapter en laboratoire et sont des animaux faciles à manipuler et à élever.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 250 souris.

Le temps minimum d'immunisation est de 35 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque ni pour les utilisateurs ni pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

**9442** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

L'effectif des animaux engagés dans chaque protocole est établi en corrélation avec la quantité d'immun-sérum à produire et selon les rendements précédemment obtenus. En se basant sur ces données, nous faisons une demande pour 15 protocoles, représentant 300 lapins.

La période d'immunisation est de 357 jours. Cette durée permet l'obtention d'une grande quantité d'anticorps spécifiques à un lot composé de plusieurs lapins.

Les immun-sérums récupérés sont ensuite purifiés par le client afin de récupérer les anticorps spécifiques de l'antigène d'intérêt. Ces anticorps sont produits en grande quantité pour entrer dans la fabrication de trousse de diagnostic à grande échelle.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque ni pour les utilisateurs ni pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré modéré en raison de l'utilisation d'adjuvant. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux.

Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes, plateforme...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9443** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève

des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 1100 protocoles, représentant 2200 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9444** Les maladies inflammatoires de l'intestin constituent encore aujourd'hui un défi médical : leur traitement ne permet généralement pas une guérison complète et s'accompagne de nombreux effets secondaires. La communauté scientifique a maintenant établi que le microbiote intestinal jouait un rôle essentiel dans le développement de ce type de pathologie. Ce microbiote représente un assemblage de nombreuses espèces de microorganismes (bactéries, champignons, virus...). Ces microorganismes interagissent entre eux et avec leur hôte, au niveau notamment de la muqueuse intestinale, elle-même en lien étroit avec le système immunitaire. Dans l'optique de proposer des compléments aux traitements actuels, notre équipe s'attache à étudier les possibilités offertes par l'utilisation de composés d'origine bactérienne ou pouvant influencer la composition du microbiote. Notre démarche repose sur l'utilisation d'étapes successives. Initialement, des criblages in vitro, utilisant des cultures de cellules de souris ou humaines, permettent de recueillir des éléments prouvant une activité anti-inflammatoire potentielle. Des bactéries ou composés candidats sont alors retenus pour des essais pré-cliniques chez des rongeurs. Nous déclenchons alors chez des animaux, à l'aide de composés chimiques, des inflammations intestinales mimant les symptômes visibles chez des patients humains. Et, dans le même temps, nous administrons nos composés candidats et mesurons leurs effets bénéfiques. Nous souhaitons ainsi, d'une part, identifier des composés actifs à l'échelle d'un être vivant complexe suffisamment comparable à l'homme avant de pouvoir éventuellement envisager un essai clinique et, d'autre part, comprendre les modes d'action de ces composés et la manière dont ils interagissent avec l'hôte et/ou le microbiote déjà présent. Nous

utilisons généralement des bactéries ayant le statut QPS européen (qualified presumption of safety, qui permet une utilisation en alimentation humaine) ou des bactéries commensales non pathogènes (isolées chez des volontaires sains). Nous sommes également amenés à étudier des composés synthétisés par des bactéries recombinantes, qui sont alors capables de produire des molécules d'intérêts de natures diverses (protéines, lipides ou autres).

Dans ce projet qui inclut des rongeurs (des souris jeunes après sevrage ou adultes), nous estimons avoir besoin d'utiliser 1 200 animaux par an, pour une durée de 5 ans, soit 6 000 animaux au total. Sur la base de notre expérience et de la littérature conséquente déjà disponible, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous réduisons également au maximum le nombre de répétition d'essais. Les procédures effectuées seront les suivantes :

Nous utiliserons deux agents chimiques différents (le DNBS 2,4 dinitrobenzenesulfonic acid et le DSS, Dextran Sodium Sulfate), chacun permettant de reproduire des symptômes sensiblement différents. Ces inflammations intestinales seront de nature chronique (plusieurs épisodes de poussées inflammatoires) ou aigue (une seule phase inflammatoire). Leur sévérité sera modéré ou faible, selon la dose de produit chimique utilisée.

Nous sommes ainsi en capacité de mimer des symptômes relatifs à la maladie de Crohn, la rectocolite ulcéreuse (ces deux pathologies formant le groupe des Intestinal Bowel Diseases), ou le syndrome de l'intestin irritable (Irritable Bowel Syndrome).

Dans tous les cas, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement afin de suivre au mieux l'évolution de la colite induite par les protocoles expérimentaux et optimiser le bien être des animaux. Des points limites ont été établis et mèneront à l'euthanasie des animaux les ayant franchis. Le milieu de vie des animaux est enrichi par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages. Les animaux seront hébergés en groupe, jusqu'à 5 par cage.

**9445** Le choc septique (défaillance multi-viscérale survenant au cours d'une infection grave associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS) est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente en pédiatrie et avec le vieillissement. Cette pathologie, dont la mortalité est comprise entre 30 et 70%, ne bénéficie d'aucun traitement adapté et conduit à la mort de plus de 55 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le choc septique se caractérise par la manifestation de au moins 2 des critères suivants : une altération de la respiration, une dérégulation de la température, une dysfonction cardiaque et un état hyper ou hypo-inflammatoire. Les traitements systématiques du choc septique se résument actuellement au remplissage vasculaire pour tenter de rétablir une pression artérielle permettant un débit de perfusion des organes suffisant à leur fonctionnement et une antibiothérapie pour contrer l'infection sous-jacente. A ce jour, les nombreuses approches thérapeutiques ciblées testées se sont avérées inefficaces dans le traitement du choc septique suggérant qu'une approche plus systémique serait plus efficace. Le développement de thérapies efficaces et l'amélioration de la prise en charge de l'adulte mais aussi des populations plus sévèrement touchées, les enfants, dépendent également d'une meilleure compréhension de la pathologie, de son développement, de la genèse des troubles cardiovasculaires (altération du rythme cardiaque, hypotension, insuffisance cardiaque). Nos études antérieures sur un traitement systémique agissant sur la O-GlcNAcylation (modification protéique ubiquitaire) sur deux modèles adultes de choc septique chez le rat ont montré des effets bénéfiques généraux (cœur, reins, foie, métabolisme) mais également une augmentation de la survie des animaux adultes. Le jeune étant différent de l'adulte de par son métabolisme et sa physiologie (fréquence cardiaque plus élevée, réserve cardiaque plus faible, pression artérielle plus faible), des études ont été réalisées afin de vérifier si les effets bénéfiques obtenus chez l'adulte pouvaient être retrouvés chez le jeune. L'ensemble des résultats obtenus montrent un effet bénéfique de notre molécule sur l'état de santé des animaux jeunes. Afin de finaliser le projet et de potentiellement entamer des recherches cliniques, une étude de mortalité est indispensable. Le modèle animal de choc septique le plus adapté est ici le modèle d'injection de Lipopolysaccharide (LPS) chez le rat, très bien documenté et maîtrisé dans notre laboratoire. Il est simple, très reproductible avec une cinétique courte et est non expérimentateur dépendant. Les expérimentations sont prévues pour Réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en ayant des données

Statistiques suffisamment puissantes et exploitables. L'expérience acquise lors des études précédentes sur l'adulte et sur le modèle de rat jeune permet à la fois un raffinement des techniques et points limites et donc de réduire le nombre d'animaux à utiliser. Les données sur la mortalité obtenues par cette étude ne peuvent pas être remplacées par un autre moyen que l'étude in vivo et sont nécessaires à la finalisation des tests de traitement. Afin de prévenir les souffrances et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude et les rats seront constamment sous une couverture anti douleur suffisante. En fin d'expérimentation, les rats seront utilisés pour établir une biocollection afin de limiter le nombre d'animaux utilisés pour l'étude. Enfin les animaux seront suivis et surveillés tout au long de l'étude, et un score sera établi afin de suivre l'état général de l'animal et donc d'éviter les souffrances et définir les conduites à tenir.

Les groupes (contrôle, malade, avec ou sans traitement de référence, avec ou sans traitement) seront constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=15 au maximum par groupe ; n=6 pour la pré étude), Au total, le projet intégrera 66 rats de 4 semaines maximum.

**9446** Ce projet aborde les mécanismes physiopathologiques de la progression de la maladie rénale chronique liée à l'acidose. L'acidose métabolique est une complication inéluctable de la maladie rénale chronique avancée et a été identifiée comme un facteur accélérant la progression de l'insuffisance rénale chronique.

L'adaptation normale du rein à l'acidose métabolique passe par une augmentation du nombre des cellules sécrétrices de protons (acide) au détriment des cellules sécrétrices de bicarbonates (base). Cette adaptation permet d'augmenter la sécrétion de protons et par conséquent l'excrétion nette d'acide par le rein. Il a été montré récemment que cette réponse adaptative implique l'induction d'une voie de signalisation faisant intervenir des protéines de l'inflammation.

Nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle cette voie de signalisation impliquée dans la réponse adaptative rénale à une charge acide pourrait aussi entraîner la survenue d'un infiltrat inflammatoire et par conséquent aggraver la maladie rénale en favorisant le développement d'une fibrose.

La maladie rénale chronique est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible la maladie humaine, permettra d'étudier les mécanismes liés à l'acidose et impliqués dans le développement de la fibrose rénale et la progression de la maladie.

Dans un premier temps, une acidose métabolique sera induite selon trois protocoles différents (administration de chlorure d'ammonium dans l'eau de boisson, administration d'une nourriture riche en protéines animales versus une nourriture riche en protéines végétales, administration de chlorure de sodium ou de bicarbonate de sodium en complément d'une nourriture riche en protéines animales) chez 2 lignées de souris sauvages de fonds génétiques différents afin d'exclure certains facteurs confondants comme la souche de souris et les molécules utilisées pour créer la charge acide. Après 3, 7, 14, 31 et 60 jours, des prélèvements urinaires et sanguins seront effectués puis les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes.

Dans un deuxième temps, nous tirerons parti de la transgénèse c'est à dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris pour tester l'implication de cette voie de signalisation dans l'infiltration du rein par des cellules inflammatoires en réponse à l'acidose.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Conformément à la réglementation de 2013 concernant l'hébergement des animaux utilisés à des fins scientifiques, les souris sont logées, avant leur utilisation, dans des cages adaptées dans les salles de stabulation de l'animalerie où l'ambiance est parfaitement contrôlée (hygrométrie, température, ventilation, bruit). Ces cages sont équipées d'enrichissement pour limiter le stress et les souris sont hébergées en groupes sociaux afin de limiter l'isolement. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des analgésiques sont prévus en cas de nécessité. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance et les souris seront profondément anesthésiées avant l'euthanasie. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant le



retrait ou l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet s'inscrit sur une durée de 3 ans. Le nombre de souris utilisées sera de 576 maximum.

Ce projet se poursuivra par l'étude d'un modèle murin de maladie rénale chronique, ce qui, à terme, nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la progression de la maladie rénale chronique liés à l'acidose métabolique. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments, ciblant les voies mises en cause, permettant ainsi de prévenir ou de freiner le développement de la fibrose au cours de la maladie rénale chronique.

**9447** La mitochondrie est un réseau tubulaire dynamique ayant un rôle essentiel dans la production d'énergie. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés « dynamique mitochondriale » permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Il correspond à un équilibre entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries et est médié par des protéines impliquées soit dans la fission (FIS1 et DRP1), soit dans la fusion (MFN1, MFN2 et OPA1).

De par ses fonctions et sa dynamique, la mitochondrie est située au centre du développement des stratégies de cardioprotection visant à prévenir les lésions de reperfusion suite à un infarctus du myocarde (IDM). Des études réalisées par différentes équipes ont montré que l'ischémie entraînait une fission mitochondriale dont l'inhibition pouvait avoir un rôle protecteur. Au sein du laboratoire, nous nous intéressons à la cardioprotection à la phase aigüe de l'infarctus. La mitochondrie est un acteur majeur de ces mécanismes de cardioprotection. Dans ce cadre nous voulons étudier sur un modèle murin double hétérozygote partiellement déficient (souris  $Opa^{+/-} Drp1^{+/-}$ ) ou non (souris  $Opa^{+/+} Drp1^{+/+}$ ) en protéine de fusion OPA1 et de fission DRP1 si des variations de la dynamique mitochondriale cardiaque peuvent expliquer en partie les mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion. Cette étude physiopathologique nous permettra secondairement l'utilisation d'agents pharmacologiques pour réguler cette dynamique et améliorer la cardioprotection.

Pour le versant vasculaire, aucune étude n'a à ce jour déterminé ni sur des vaisseaux de compliance ni sur des vaisseaux de résistance le rôle de OPA1 et DRP1. Notre hypothèse est que les fonctions vasculaires et mitochondriales évoluent en parallèle et que l'altération progressive des mitochondries perturbe la réactivité et l'adaptation vasculaire (notamment à l'hypertension) avec des conséquences dramatiques pour les organes clés comme les reins, le cœur ou le cerveau. Nous nous intéressons au rôle des protéines de fusion OPA1 et de fission mitochondriale DRP1 dans la physiopathologie vasculaire et notamment dans le développement de l'hypertension artérielle systolique qui apparaît lors du vieillissement, dû souvent à une augmentation de la pression pulsée lié à un accroissement de la rigidité artérielle.

De ce fait, ce projet a pour ambition l'identification des fonctions mitochondriales associées aux dysfonctionnements vasculaires survenant lors d'une hypertension artérielle systolique lors du vieillissement physiologique. Un des objectifs du projet sera de proposer une étude liant les activités mitochondriales et vasculaires tant sur les artères de résistances que de compliances. Cette étude se fera sur deux modèles d'animaux hypertendus (traitement au L-NAME et pompes osmotique à l'angiotensine II) ou non et/ou déficients dans leur fonction mitochondriale. Nous pourrons utiliser tant des souris transgéniques déficiente en OPA1 et DRP, ou des inhibiteurs pharmacologiques comme la roténone (complexe I) ou le malonate (complexe II) de la mitochondrie.

Cette étude sera réalisée chez la souris qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu et l'étude de l'hypertension artérielle. Ces modèles sont validés et sont parfaitement maîtrisés au laboratoire.

576 souris au total seront utilisées pour ce projet. Le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux. Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Pour la procédure chirurgicale d'infarctus du myocarde, nous utiliserons un anesthésique et un analgésique aux doses appropriées (pentobarbital sodique 90mg/Kg et buprénorphine 0.1mg/Kg). Pour la mise en place des pompes osmotiques, nous utiliserons l'isoflurane et la buprénorphine 0.1mg/Kg (temps d'opération environ 10min). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu ou de l'hypertension artérielle.

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant, touchant environ un garçon sur 5000 à la naissance. Elle résulte d'une mutation dans le gène *Dmd* situé sur le chromosome X, codant pour la Dystrophine. L'absence d'expression de la Dystrophine génère une fragilité des fibres musculaires et leur dégénérescence progressive. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Le déficit en Dystrophine diminue les capacités motrices dès l'âge de 5 ans. La marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement vers 30/40 ans, suite à une insuffisance respiratoire et/ou cardiaque.

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif sur le marché, et la thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie. L'évaluation d'un traitement de thérapie génique chez l'Homme nécessite au préalable une évaluation pré-clinique faisant preuve de son efficacité *in vivo*. Pour qu'une évaluation pré-clinique soit pertinente, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal qui mime le phénotype du patient DMD. Deux modèles animaux de la DMD, portant une mutation dans leur gène *Dmd*, ont été historiquement utilisés : la souris *mdx* et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy). La souris *mdx* est loin d'être un modèle parfait puisqu'elle présente un phénotype peu sévère, avec seulement quelques aspects des lésions musculaires humaines et une fonction cardiaque peu et très tardivement atteinte. Le chien GRMD, quant à lui, se rapproche beaucoup plus de la pathologie humaine, à la fois au niveau des lésions musculaires observées qu'au niveau de son phénotype (espérance de vie très raccourcie). Il présente cependant des lésions cardiaques hétérogènes entre individus et la grande taille de ce modèle pose des problèmes d'entretien, de coût, ainsi qu'éthiques. De ce fait, seules des petites cohortes expérimentales peuvent être utilisées, rendant difficile les analyses statistiques.

En 2014, un nouveau modèle de rat DMD a été généré par transgénèse. Chez ce rat DMD $mdx$ , les dommages musculaires sont très proches de ceux des patients DMD (nécrose, régénération, puis fibrose et adipeuse) et celui-ci développe une cardiomyopathie comparable à celle observée chez le patient, contrairement aux autres modèles animaux de la DMD. Ce nouveau modèle animal de la DMD se révèle donc particulièrement intéressant, et permet d'inclure un nombre plus important d'animaux dans des études.

Lors d'une précédente étude nommée « Caractérisation exhaustive du rat DMD $mdx$ , nouveau modèle animale de la Dystrophie Musculaire de Duchenne » (APAFIS #5996-2016070618053653v3), notre équipe a caractérisé de façon exhaustive le rat DMD $mdx$  (à différents âges), que ce soit au niveau phénotypique, au niveau histologique, au niveau physiologique et au niveau moléculaire, et ainsi confirmer la pertinence de ce nouveau modèle animal de la DMD. Cette caractérisation a également permis de cumuler des données contrôles de référence pour les futurs essais pré-cliniques d'évaluation de traitements potentiels de la DMD qui seront réalisées dans ce modèle animal.

Plusieurs produits thérapeutiques candidats sont aujourd'hui envisagés. Le potentiel de ces stratégies a été dans un premier temps testé dans des modèles cellulaires. Cependant, les méthodes *in vitro* actuelles ne permettent pas l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de ces thérapies à l'échelle de l'organisme entier, comme cela est nécessaire pour une pathologie aussi complexe que la DMD. Notre équipe souhaite donc évaluer ces traitements de thérapie génique dans le modèle de rat DMD $mdx$ , que ce soit pour traiter l'atteinte musculaire, cardiaque ou respiratoire.

Pour établir un plan d'étude pré-clinique cohérent et pertinent, un des enjeux est de choisir les bonnes méthodes d'évaluation du traitement, mais aussi d'inclure un nombre suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique qui aboutisse à des résultats exploitables. C'est dans cet objectif que nous souhaitons réaliser différentes études "pilotes" précédant de plus larges projets pré-cliniques, afin de collecter des données préliminaires et déterminer (i) les méthodes d'évaluation pertinentes pour chacun de ces produits et (ii) le nombre d'animaux à inclure dans les futurs projets pré-cliniques, en fonction de la puissance de chacune de ces méthodes. Ces études pré-cliniques pilotes permettront ainsi l'établissement d'un plan d'étude cohérent et adapté à une problématique d'une étude précise, afin donc de répondre au mieux à la règle des 3R.

Dans ce projet s'étalant sur 5 ans, nous réaliseront un maximum de 15 études pilotes comportant entre 5 et 10 rats DMD $mdx$  par groupe expérimental. Un total maximum de 360 rats DMD $mdx$  seront inclus dans ces études pilotes (rats DMD $mdx$  injectés et non injectés) ainsi que 120 rats sains contrôles. Avec l'objection de réduction (règle des 3R), le nombre d'animaux par groupe est basé sur

notre expérience de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats exploitables avec ces effectifs. Le nombre précis d'animaux par groupe (entre 5 et 10), les paramètres évalués ainsi que la durée de suivi des animaux seront ajustés en fonction du produit et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie intramusculaire ou intraveineuse.

Il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique in vivo. L'animal est le seul organisme vivant permettant d'étudier l'impact d'un transfert de gène dans différents types cellulaires (différents organes) et sur son phénotype, en lien avec le mode d'administration utilisé et la dose administrée.

Avec l'objectif de raffinement (règle des 3R), les protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales. L'état général de chaque animal sera surveillé de façon quotidienne pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Si nécessaire, l'euthanasie de l'animal sera anticipé.

**9449** L'objectif de ce projet est d'évaluer la fréquence et l'impact du transfert de gènes entre les espèces bactériennes qui composent le microbiote intestinal de souris. Cet objectif est d'autant plus important que de nombreuses études récentes ont révélé l'importance des microbiotes pour la santé de l'hôte auquel ils sont associés. On sait aujourd'hui que le microbiote intestinal joue un rôle central dans les mécanismes d'immunité, de susceptibilité aux infections ou même dans certains cancers. Toutes modifications de la composition de ces communautés (dysbiose) perturbent l'équilibre des interactions établies entre le microbiote et son hôte et peuvent se traduire par des effets physiologiques néfastes. Dans ce contexte, il apparaît important d'étudier les mécanismes de transfert de gènes et leur impact au sein du microbiote intestinal en utilisant des systèmes expérimentaux in vivo. En effet, les modèles de culture in vitro de lignées cellulaires ne permettent pas de modéliser les interactions à l'échelle d'un corps (microbiote, cellules immunitaires, fibroblastes, vaisseaux...). Le recours à des modèles pré-cliniques in vivo est donc indispensable pour mieux comprendre le microbiote intestinal.

Le transfert de gènes participe à l'évolution rapide des génomes bactériens en facilitant la dissémination de capacités métaboliques pouvant conférer des avantages sélectifs à la souche receveuse. L'exemple le plus important est la propagation de résistances aux antimicrobiens, laquelle est un problème majeur de santé publique et une priorité d'étude pour la recherche scientifique. Les mécanismes moléculaires du transfert horizontal de gènes ont été largement étudiés par des approches génétiques et biochimiques, en revanche très peu d'études se sont intéressées au transfert au sein de communautés bactériennes naturelles. Ainsi, la fréquence des événements de conjugaison ainsi que leur impact sur la dynamique génétique des populations bactériennes restent à étudier. C'est le premier objectif de notre étude qui permettra de prendre la mesure de la fréquence du transfert de gène associé à différents éléments conjuguatifs transférables. Le deuxième objectif du projet est d'utiliser la conjugaison pour modifier la composition du microbiote intestinal de manière dirigée. Pour ce faire, nous allons utiliser la conjugaison bactérienne pour transférer des plasmides portant des gènes toxiques ayant une activité antimicrobienne sur souches receveuse ciblées.

Ces deux objectifs seront atteints à travers deux procédures expérimentales distinctes. La première procédure est basée sur l'étude du transfert d'un 'monitoring-plasmide' portant un gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente (iRFP670). Le suivi de la dissémination de ce plasmide au sein du microbiote intestinal sera réalisé par tomographie de souris endormies. La deuxième procédure est basée sur l'étude du transfert d'un 'recipient-killing plasmid' portant les gènes toxiques. L'impact du transfert de ce plasmide dans la population sera mesuré par séquençage du microbiote à partir d'ADN extrait de fèces de souris. Chacune de ces deux procédures sera réalisées sur des souris avec microbiote naturel, ou avec microbiote simplifié (par prétraitement antibiotiques).

Le plan expérimental proposé permet de réduire le nombre de souris utilisées, tout en disposant d'un nombre suffisant d'individus pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera réduit à son minimum, sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal (utilisation d'anesthésique, mise en place de points limites...).

Ce projet inclura au total 468 souris.

**9450** L'inhalation est une voie non invasive d'administration de médicaments qui s'est énormément développée ces dernières années. Les aérosols sont des systèmes très prometteurs car ils permettent de déposer efficacement les substances actives au niveau des poumons, même profonds (alvéoles) et de libérer localement des quantités importantes de substances actives, favorisant ainsi un effet thérapeutique rapide et optimal, là où il faudrait des doses beaucoup plus élevées par les autres voies d'administration qui engendreraient des effets secondaires.

Les applications thérapeutiques sont nombreuses et nous nous intéressons plus particulièrement à l'asthme et la tuberculose qui constituent deux problèmes majeurs de santé publique.

L'asthme est une maladie chronique inflammatoire des voies respiratoires qui apparaît par crises plus ou moins sévères au cours desquelles la personne éprouve des difficultés à respirer. Depuis 40 ans, la prévalence de l'asthme a considérablement augmenté, en raison notamment des allergies en progression elles aussi. La population dans le monde souffrant d'asthme est évaluée à 235 millions de personnes. Les traitements antiasthmatiques à base de corticostéroïdes peuvent être administrés par différentes voies (orale, injection) mais la voie pulmonaire est souvent préférée en raison de la délivrance du médicament directement sur le site d'action. Cependant, la durée de l'effet est courte et les quantités déposées faibles, nécessitant des administrations répétées.

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par une bactérie dont la forme la plus fréquente est pulmonaire avec la formation de granulome sur lesquels les traitements classiques (par voie orale ou par injection) sont inefficaces. Elle tue près d'1,8 millions de personnes chaque année dans le monde. La synergie avec l'épidémie de sida et l'émergence de bacilles multirésistants aux antibiotiques contribuent à aggraver l'impact de cette maladie, considérée comme une urgence sanitaire par l'Organisation Mondiale de la Santé. Aujourd'hui, une association d'antibiotiques est utilisée pour traiter les tuberculeux, mais le traitement doit être suivi au minimum six mois (et jusqu'à deux ans). Un traitement incomplet ou mal suivi est responsable de l'apparition de tuberculoses résistantes aux antibiotiques qui sont ensuite transmises dans la communauté.

Les retombées potentielles de ce projet pour la santé humaine sont donc considérables.

La finalité de ce projet est de concevoir de nouvelles formulations de principes actifs pour des administrations par inhalation pour (i) dans le cas de l'asthme, augmenter le temps de résidence des corticoïdes dans les poumons grâce à des systèmes à libération prolongée qui permettent de réduire le nombre d'administration et (ii) dans le cas de la tuberculose, cibler les poumons pour y délivrer des doses thérapeutiques d'antibiotiques localement élevées et efficaces ; avec pour conséquence de réduire la dose corporelle totale par rapport aux voies orale ou intraveineuses et ainsi diminuer les effets secondaires et les phénomènes de résistance pour les antibiotiques.

Notre équipe développe des formulations de poudre sèches composées de microparticules qui permettent l'administration de quantités élevées de substance active en utilisant un simple dispositif d'inhalation. Ces formulations ont été évaluées et sélectionnées dans un premier temps sur des lignées cellulaires de macrophages, les macrophages pulmonaires étant impliqués dans le processus inflammatoire. Elles nécessitent maintenant d'être testées in vivo.

Le ciblage pulmonaire et le dépôt dans le poumon profond au niveau des alvéoles ainsi que les échanges avec le compartiment sanguin ne peuvent être modélisés in vitro et nécessitent une étude sur l'animal.

L'objectif de cette étude in vivo est d'évaluer, sur animal sain, la pharmacocinétique de ces nouvelles formulations après administration par inhalation et de connaître la concentration en principe actif dans le poumon et dans le sang afin d'optimiser le protocole thérapeutique. Ces études sont indispensables avant d'envisager des études d'efficacité sur un modèle d'asthme ou de tuberculose. Nous étudierons 4 formulations galéniques : deux types de microparticules encapsulant le budésonide pour le traitement de l'asthme et 2 formulations encapsulant la rifapentine, un antibiotique utilisé dans le traitement de la tuberculose.

Pour cela, des rats recevront une administration des formulations par insufflation dans la trachée et des prélèvements sanguins seront effectués à différents temps sur 48h, au maximum 3 par animal. L'animal sera ensuite euthanasié et un lavage bronchoalvéolaire sera effectué afin de déterminer la quantité de principe actif présent dans les poumons. Les procédures se dérouleront sous anesthésie.

Les procédures expérimentales seront menées sur un nombre limité mais nécessaire d'animaux grâce à une planification statistique minutieuse et ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des animaux. Le nombre a été évalué à 356 rats.

Le bien être des animaux sera également pris en compte. Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

**9451** La sélection intense sur les performances de production conduit à des animaux plus efficaces mais aussi plus exigeants et moins robustes, c'est-à-dire moins capables de s'adapter face aux perturbations de leur environnement, avec des conséquences négatives sur la santé et le bien être. La phase de démarrage, cruciale pour le devenir des animaux, est devenue particulièrement délicate à gérer, et dépend de la qualité initiale du poussin. Pendant cette période, les poussins sont soumis à plusieurs perturbations d'environnement telles que des changements de température, de confinement, des vibrations pendant leur transport entre le couvoir et leur installation en bâtiment d'élevage et, la plupart du temps, ils n'ont pas accès à l'eau de boisson et la nourriture avant 24 h post-éclosion. Si les poussins peuvent puiser leurs ressources dans le sac vitellin pendant les jours qui suivent l'éclosion, il est maintenant bien démontré que leur environnement précoce influence le comportement des poulets en fin d'élevage, leurs performances de production et leur sensibilité aux maladies. Les opérateurs évaluent la qualité des poussins à l'aide d'indicateurs d'appréciation visuelle qui restent subjectifs et ne rendent pas compte des multiples composantes de cette qualité (développement morphologique, physiologique, immunitaire...). L'amélioration de la robustesse des animaux au jeune âge passe donc par l'identification de nouveaux indicateurs et biomarqueurs de la qualité du poussin. Le projet a pour ambition de combiner phénotypage à haut débit et méthodes intégrées d'analyse de données pour revisiter la mesure de la qualité des poussins et proposer un outil partagé par les acteurs de la sélection, de l'accoupage et de l'élevage.

REMPACEMENT : compte-tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : 500 œufs embryonnés seront utilisés pour chaque lignée, soit 2000 œufs. Les taux de fertilité étant de l'ordre de 50% pour la moins bonne des lignées, cela laisse espérer 250 individus éclos possibles par lignée moins les lots d'œufs utilisés pour les stades embryonnaires (3 X 30 œufs) et le lot sélectionné pour les prélèvements à J0 (40 X 4) : soit environ 120 animaux par lignée (4 lignées) qui seront utilisés dans la mise en place avec stress au démarrage. Ce nombre est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de nos expériences précédentes et de la variabilité interindividuelle attendue pour ces observations et analyses biologiques.

RAFFINEMENT : Les poussins seront hébergés dans des parquets à une densité très inférieure au maximum autorisé. Les animaux seront élevés en groupe au sol sur un lit de copeaux avec une alimentation et un abreuvement ad libitum. Un enrichissement leur sera proposé (blocs à piquer, balles en plastique, tubes...). Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer leur environnement. Ils seront visités deux fois par jour.

**9452** La fièvre jaune est une maladie infectieuse causée par un virus (YFV), transmis par la piqûre de moustiques infectés. La maladie présente un large spectre de symptômes allant de la fièvre hémorragique légère à sévère et mortelle chez les humains et les primates non humains. Malgré la disponibilité de vaccins efficaces, la fièvre jaune reste un problème majeur de santé publique en Afrique et en Amérique du Sud, avec une incidence annuelle d'environ 200 000 cas et 30 000 décès. Récemment, le Brésil a été atteint par une épidémie de fièvre jaune, la plus sévère au cours des 70 dernières années. De décembre 2016 à juillet 2017, 777 cas humains avec 261 décès ont été confirmés. La souche virale responsable de cette épidémie présente plusieurs mutations. Ces mutations peuvent affecter le cycle biologique du virus dont la réplication chez les deux hôtes : moustiques et hôtes vertébrés. Par conséquent, l'objectif de cette étude est d'évaluer si le virus épidémique du Brésil portant ces mutations peut être plus virulent pour l'hôte vertébré, cause possible de la forte mortalité observée durant l'épidémie.

Dans ce but, nous allons faire appel à un modèle animal, la souris car aucun modèle cellulaire n'est à ce jour disponible pour mimer l'infection par le virus dans un système complexe comme l'hôte vertébré. Les souris seront infectées expérimentalement avec deux souches virales appartenant au même génotype et à la même lignée : (i) une souche présentant les mutations mentionnées et (ii) une autre souche qui est identique à la précédente mais dépourvue de ces mutations. Les souris sont naturellement résistantes à l'infection par le YFV. De ce fait, nous devons utiliser :

- des souris immunodéprimées (lignées A129) pour évaluer (i) le tropisme du virus vers les viscères (viscérotropisme), (ii) le tropisme vers le système nerveux (neurotropisme), et la pathogénicité qui en résulte, et (iii) la mortalité.

Pour évaluer le viscérotropisme, le neurotropisme et la mortalité, nous injecterons le virus par la voie sous-cutanée (peau lâche au niveau du cou) à un maximum de 348 souris femelles des lignées A129, âgées de 3-4 semaines. La dissémination virale dans différents organes sera évaluée pour des groupes d'animaux, entre 1 et 15 jours après l'infection. Pour cela, les animaux seront anesthésiés puis euthanasiés pour l'obtention des échantillons de rate, de foie, de cerveau et de sang. Nous allons aussi déterminer la concentration de certaines protéines dans le sérum animal pour évaluer les dommages causés aux organes vitaux tels que le foie et les reins.

Les animaux seront surveillés tous les jours pour les symptômes (léthargie, posture voûtée, paralysie des membres postérieurs...) jusqu'à 30 jours. En cas de détection de signes de souffrance, les animaux seront immédiatement euthanasiés après l'anesthésie profonde.

**9453** Le projet vise à analyser les effets des matières en suspension (MES) sur la physiologie des espèces de poissons communes dans les grandes rivières. Les sédiments fins s'accumulent au niveau des retenues ou des écluses, entravant la navigation et le bon fonctionnement des centrales hydroélectriques. Ces matériaux sont régulièrement évacués lors de dragages ou lors de vidanges des retenues et sont alors remis en suspension, ce qui provoque une augmentation importante de la turbidité de l'eau sur plusieurs kilomètres. Une approche en milieu contrôlé est nécessaire afin de pouvoir isoler le facteur d'intérêt (concentration en MES) et analyser ses effets sur la mortalité des poissons, leur condition, et différents indicateurs physiologiques. Des tests d'exposition de poissons à différentes concentrations de MES sont requis, le modèle animal ne pouvant pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement). Les résultats obtenus permettront de discuter les normes actuellement en vigueur concernant le relargage de MES.

Cette phase II du projet intervient après une première série d'expérimentations menée depuis 2015 sur la truite fario et le gardon. Les concentrations en MES n'étant alors pas suffisantes pour mettre en évidence un gradient d'effets sur la physiologie des poissons, le protocole a été revu. Les principales différences concernent : 1. les concentrations en MES qui ont été rehaussées pour mieux correspondre aux charges en MES observées au moment des vidanges de retenues ; 2. l'ajout de prélèvement sanguins ; 3. l'optimisation du protocole, avec d'une part une réduction des effectifs et d'autre part l'amélioration des conditions expérimentales (qualité et fréquences des renouvellement d'eau, suivis de la qualité physico-chimique de l'eau, réduction du stress induit par le dispositif). Ces modifications visent à mieux identifier les perturbations physiologiques potentiellement induites par l'exposition aux matières en suspension.

Des juvéniles de 3 espèces de poissons caractéristiques des grandes rivières (truite fario et deux cyprinidés communs) seront utilisés. L'expérience sera réalisée 5 fois : 3 fois sur des truites fario (exposition à 3 différentes origines de MES présentant différents niveaux de contamination en micropolluants), 1 fois sur chacun des deux cyprinidés. Pour chaque expérience, l'effectif sera de 340 juvéniles (6-8 g grammes de poids moyen) : 40 juvéniles pour les pré-tests d'acclimatation et de validation du dispositif et des concentrations (règle des 3 R : Raffinement), puis 300 juvéniles pour l'expérience proprement dite. Au total 1700 poissons seront utilisés et euthanasiés.

Lors de chaque expérience, les 300 juvéniles seront répartis dans 12 aquariums et exposés à 4 différentes concentrations de MES (de 0 à 2000 mg/L). La durée d'exposition est de 4 semaines et correspond à la durée moyenne des opérations de remise en suspension des sédiments en rivière. Après 4 semaines, les MES seront retirées et la résilience sera étudiée après 2 semaines. Des prélèvements seront réalisés à 5 occasions. L'effectif de 5 individus prélevés par aquarium est un

minimum pour prendre en compte la variabilité des réponses physiologiques, tout en limitant au maximum le nombre d'individus mis à mort (règle des 3 R : Réduction).

**9454** Les maladies psychiatriques, notamment l'addiction aux drogues qui présente en outre une forte comorbidité avec d'autres pathologies telles que la schizophrénie, entraînent la mort de millions de gens chaque année. Les stratégies de prévention et de soin mises en place se sont avérées jusqu'alors largement insuffisantes à diminuer le nombre de sujets malades. Une partie de ces morts seront pourtant évitables lorsque l'on aura élucidé les mécanismes qui conduisent à ces pathologies. Un nombre croissant d'études ont identifié un rôle important des récepteurs sur lesquels se fixe la nicotine, appelés récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, dans les processus cognitifs et émotionnels, qui sont notamment altérés au cours de nombreuses maladies psychiatriques comme la schizophrénie et l'addiction. Ces récepteurs sont constitués de différents assemblages possibles de sous-unités alpha et beta aux propriétés fonctionnelles distinctes. Notre objectif est de caractériser le rôle de deux sous-unités majeures du récepteur nicotinique dans certains de ces processus, et d'identifier les circuits cérébraux impliqués dans leurs mécanismes d'action. Nous proposons pour cela d'utiliser plusieurs approches, telles que i) moduler l'expression des gènes de ces sous-unités nicotiques dans certaines régions cérébrales en particulier, ii) moduler les niveaux d'activité de structures cérébrales d'intérêt, chez des rats contrôles non mutés ou transgéniques pour l'une de ces sous-unités du récepteur nicotinique. Nous étudierons alors les conséquences de telles manipulations sur le comportement des animaux dans des procédures visant à modéliser différentes fonctions cognitives impliquées dans des pathologies psychiatriques telles que l'addiction et la schizophrénie, grâce à l'utilisation de procédures de choix. Nous pourrions ainsi, en fonction des résultats obtenus, tenter de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces pathologies, en ciblant notamment le système cholinergique nicotinique. Nous anticipons l'utilisation d'un maximum de 912 rats, mâles âgés de 8 semaines à 12 mois. 4 procédures expérimentales seront utilisées de classe modérée. Le bénéfice attendu de cette étude est de comprendre les circuits neurobiologiques qui sous-tendent les capacités cognitives et de prise de décision. Il est impossible d'utiliser des modèles cellulaires et l'utilisation d'animaux mis en situation de tâches comportementales, où leur mode de prise de décision et leurs capacités cognitives peuvent être évaluées, est absolument requise. Certains apprentissages et renforcements simples peuvent être évalués chez le poisson ou certains invertébrés. Cependant, l'intérêt de notre étude est de cibler des processus cognitifs complexes, impliqués au cours de pathologies psychiatriques qui se développent progressivement au cours de la vie de l'individu. Pour cela, nous emploierons des procédures spécifiques pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent chez les modèles poisson ou invertébré. C'est le cas par exemple de l'auto-administration de drogues sur le long terme qui permet de simuler certaines phases clé de l'addiction comme la rechute après abstinence. L'utilisation de poissons et invertébrés est également très limitée pour tester les fonctions cognitives élaborées altérées au cours des troubles psychiatriques de par l'absence de certaines régions cérébrales comme le cortex préfrontal, crucialement impliquées dans ces pathologies. En outre, le Rat représente le modèle mammifère de choix pour modéliser ces processus avec la plus grande validité d'apparence, notamment car certaines régions cruciales telles que le cortex préfrontal présentent une complexité plus importante et plus proche du primate que chez la Souris, et également parce que sa taille permet l'auto-administration intraveineuse de drogue sur un laps de temps beaucoup plus important. Enfin, le Rat s'habitue beaucoup mieux à être manipulé par l'expérimentateur et il est plus facile de faire disparaître son stress. Nous réduirons au minimum possible (ni trop, ni trop peu, en utilisant les outils statistiques appropriés) le nombre d'animaux utilisés et prendrons toutes précautions pour éviter une souffrance psychologique et physique par l'utilisation de conditions optimales, au niveau de l'hébergement, du suivi et des soins. En particulier, nous prendrons en charge la douleur et les altérations du bien être potentiellement induite par les chirurgies par administration d'antalgiques et d'anesthésiques, par un suivi assidu des animaux en post-opératoire, y compris des zones de suture, en apportant les soins recommandés si des complications sont observés, et en euthanasiant les animaux dès que les premiers signes de souffrance apparaissent. Aucun dommage n'est attendu concernant les expériences de comportement.

**9455** Dans ce projet, nous avons pour objectif de découvrir certaines lésions du génome (ADN) et de certains gènes qui sont à l'origine de la transformation des lymphocytes en tumeur. Dans ce but, nous utiliserons des modèles murins qui développent spontanément de l'instabilité génomique et des cancers lymphoïdes proches de ceux observés chez l'homme. Ces modèles murins présentent des mutations dans des gènes de facteurs clefs de la régulation des processus de recombinaison somatique (recombinaison des gènes codant pour les récepteurs aux antigènes) impliqués dans le développement des lymphomes et leucémies.

Nous utiliserons les données obtenues dans nos modèles murins pour mieux comprendre l'origine des mutations somatiques observées dans les leucémies et lymphomes humains.

Ce projet vise à étudier *in vivo* les conséquences de la dérégulation de ces processus de recombinaison sur l'apparition de l'instabilité génomique et la transformation cellulaire. L'analyse de la fonction des facteurs de signalisation et des protéines impliquées dans ces processus dans des conditions expérimentales *in vitro* (protéines purifiées, extraits cellulaires, etc.) et dans des lignées cellulaires humaines, murines ou de hamster ont été bénéfiques à la compréhension des mécanismes de recombinaison de l'ADN. Cependant, ces études ont montré leurs limites pour étudier *in vivo* les conséquences de la dérégulation de ces processus de recombinaison sur l'apparition de l'instabilité génomique et la transformation cellulaire. Pour ce faire, nous avons besoin d'une approche génétique dans un modèle biologique proche de celui du système immunitaire et lymphoïde humain. De ce fait, la souris est l'organisme approprié pour conduire ce projet.

Nous génèrerons puis utiliserons 2131 animaux pour ce projet qui nécessitent 3 procédures de sévérité modérée. La première procédure concerne l'élevage d'animaux à phénotype dommageable et nécessite 1620 animaux. La seconde concerne le prélèvement d'organes lymphoïdes sur animaux à phénotype dommageable et utilisera 241 animaux. Quant à la dernière, elle concerne l'injection de cellules hématopoïétique pré-leucémiques et leucémiques dans des animaux receveurs et nécessite 270 animaux. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type ainsi que sur le test statistique log-rank test. Ce nombre tient compte d'un minimum de cellules à collecter pour l'analyse et inclut pour chaque série d'expérience le nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la nécessité de reproduire les résultats et d'éviter les erreurs d'interprétation.

Les souris développant des tumeurs pourront devenir léthargiques, maigrir et avoir des difficultés à respirer. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition des symptômes ou à la fin de l'étude pour les animaux ne développant pas de tumeurs.

Le suivi de l'état général des souris sera effectué régulièrement (trois fois par semaine) pour ne pas dépasser les points limites prédéfinis. Ce suivi permettra de détecter des signes cliniques anormaux (dégradation de l'état général, état corporel, isolement de l'animal, difficulté à respirer, position courbée, etc.).

Les souris seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

**9456** *Listeria monocytogenes* (Lm) est la bactérie responsable de la listériose, maladie humaine d'origine alimentaire dont le taux de mortalité est d'environ 30 %. Des résultats récents ont montré que certains groupes de souches de Lm (appelés complexes clonaux), sont plus associés aux infections humaines, alors que d'autres, qui causent plus rarement des infections, sont principalement présents dans l'environnement ou la nourriture. Les souches des complexes clonaux associées aux infections humaines sont plus virulentes dans un modèle animal (souris) et provoquent pour certaines des encéphalites et méningites associées à une infection du cerveau et des méninges qui l'entourent. Nous cherchons à présent à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette virulence aux différentes étapes de l'infection : colonisation du tube digestif, traversée de la barrière intestinale, survie dans le compartiment sanguin ou les organes internes, pénétration dans le cerveau.

Le bénéfice attendu de ce projet est de comprendre comment les souches plus virulentes contournent la réponse de l'hôte pour induire une infection. La mise en évidence des mécanismes bactériens permettra de développer des outils diagnostics indicateurs du risque d'infection dû aux souches de Lm trouvées dans l'environnement. Cette étude nous permettra également de mieux décrire la réponse immunitaire de l'hôte, notamment au niveau intestinal, qui pourra être utilisée pour le



développement de vaccins dérivés de Lm ou pour la modulation de la réponse immunitaire intestinale (meilleure délivrance de traitements par exemple).

Le recours à l'animal est nécessaire pour cette étude, la réponse globale de l'hôte à une infection ne pouvant pas actuellement être modélisée in vitro dans toute sa complexité.

L'estimation du nombre d'animaux utilisés permettra d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. Elle correspond au nombre minimum nécessaire à un traitement statistique correct.

Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Les expériences de colonisation du tube digestif seront effectuées sur des grilles, en présence d'un abri permettant aux animaux de reposer leurs pattes si besoin, et de papier pour enrichir leur environnement. Les expériences impliquant des actes de chirurgie seront réalisées sous anesthésie en présence d'un analgésique pour supprimer la douleur. Tous les animaux seront suivis régulièrement au cours de l'expérimentation.

Les doses d'infection sont calculées pour induire une listériose sans entraîner le décès de l'animal. Cependant, si certains animaux atteignent des points limites définis, ils seront euthanasiés.

Ce projet nécessitera 1450 souris, sur 5 ans, réparties en 4 procédures de classe modérée et une procédure sans réveil.

**9457** Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire

l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 13 protocoles, représentant 260 rats.

Le temps minimum d'immunisation est de 85 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

**9458** Pour tous les éleveurs, il est nécessaire d'optimiser des rations alimentaires des bovins laitiers pour concilier des objectifs d'efficacité alimentaire, de qualité du lait, de bien être animal et de maîtrise des risques pour l'environnement des élevages laitiers tout en anticipant les possibles problèmes liés aux évolutions climatiques. Pour proposer des outils pour y parvenir, la valeur alimentaire des aliments doit être quantifiées et parfois des flux digestifs doivent être mesurés pour comprendre à l'échelle de l'animal, les mécanismes déterminants l'efficacité alimentaire d'une ration ou la qualité des produits qui en découle et en particulier pour quantifier les transformations des aliments en nutriments.

Les bovins sont des ruminants et ils se distinguent des espèces monogastriques par la présence en amont de la caillette (assimilable à l'estomac) d'un rumen, immense bio-fermenteur représentant 70% du volume du tube digestif et contenant plusieurs milliards de bactéries, protozoaires et champignons. Cette particularité digestive conduit à une prévision difficile de la valeur alimentaire des aliments. L'utilisation ponctuelles de vaches canulées au niveau ruminal et duodéal permet (1) de recourir à plusieurs protocoles standardisés de caractérisation des aliments (2) de prélever des contenus ruminiaux et duodénaux afin d'analyser leur flux de nutriments transitant vers les intestins, (3) de pratiquer des perfusions digestives de nutriments en quantité connues en aval du rumen afin de mieux connaître les réponses physiologiques des animaux à des nutriments bien caractérisés d'un point de vue qualitatif et quantitatif, puisque non transformés au niveau ruminal. Une gestion raisonnée d'un troupeau de vaches canulées permet de répondre à ces objectifs tout en limitant de façon très conséquente le nombre de chirurgies réalisées. Cette demande d'autorisation se rapporte donc à l'opération de 3 à 5 vaches par an pour la réalisation de plusieurs projets expérimentaux qui donneront lieu systématiquement à des demandes spécifiques d'autorisation. Ces vaches intégreront un troupeau de vaches canulés dont l'effectif sera au maximum de 28. L'objectif de cette demande est de soumettre à évaluation les procédures chirurgicales et les soins apportés aux vaches canulées lorsqu'elles ne sont pas incluses dans des projets expérimentaux, ainsi que les protocoles standardisés d'évaluation des aliments répétés chaque année.

Cette demande répond au principe des 3R. Conformément au principe de remplacement, l'usage de vaches canulées est avant tout destiné à valider ou à réactualiser des méthodes d'estimation en routine de la valeur des aliments en laboratoire ne nécessitant plus de recours aux animaux ou à alimenter des modèles de prédiction des réponses des vaches au rationnement. Conformément au principe de réduction, le nombre d'animaux canulés utilisés dans les expérimentations est toujours réduit à son minimum en assurant une puissance statistique suffisante et une mutualisation des chirurgies entre plusieurs équipes est proposée pour réduire le nombre de vaches opérées. Conformément au principe du raffinement, l'opération régulière de quelques animaux par an permet une prise en charge toujours actualisée de la douleur péri-chirurgicale et la possibilité d'une conduite adaptée et respectueuse de ces animaux dans des conditions très similaires à celles de vaches laitières non opérées.

**9459** La maladie de Huntington (HD) est une maladie neurodégénérative qui affecte spécifiquement les neurones du striatum chez les jeunes adultes. La HD se manifeste par des troubles cognitifs et de coordination musculaire. Cette maladie devient fatale 10-15 ans après l'apparition des premiers symptômes. La HD n'a actuellement aucun traitement. Elle est causée par une mutation du gène qui code pour la protéine huntingtine (HTT). Chez les patients porteurs de la mutation on observe des problèmes respiratoires tels que la rigidité des muscles de la cage thoracique, une faiblesse musculaire, des problèmes de déglutition. Actuellement il y a très peu d'informations disponibles sur la fonction respiratoire des patients ayant cette mutation. Pourtant, à un stade avancé de la maladie, les troubles respiratoires et de déglutition deviennent la première cause de décès chez ces patients. Dans le muscle squelettique le couplage excitation-contraction se traduit par l'activation du récepteur de la ryanodine (RyR1) qui est un canal calcique situé sur le réticulum sarcoplasmique pour induire une libération du calcium nécessaire pour la contraction musculaire. Il a été établi que les modifications post-traductionnelles du RyR1 lié au stress oxydant à l'activation de la protéine kinase A (PKA) suite un stress catécholaminergique induisent une perturbation de l'homéostasie calcique et induit une dysfonction contractile musculaire qui s'observe notamment au cours du vieillissement, de la myopathie du Duchenne, de la dysfonction diaphragmatique induite par la ventilation mécanique. Cependant la dysfonction diaphragmatique dans la maladie HD et ses mécanismes subcellulaires restent à élucider. La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris transgénique porteuse d'une mutation mimant la forme humaine de la HD (nombre estimé : 90 animaux sur 3 ans). Nous respecterons le principe des 3R. Une étude animale permet d'aborder les aspects fonctionnels et moléculaires de la pathologie. Il n'existe aucune autre méthode alternative qui permet d'évaluer la fonction respiratoire d'une façon intégrée. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences afin de Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites. Nous évaluerons le niveau de souffrance de l'animal en appréciant la prise alimentaire, l'état de prostration et l'hydratation. Si les points limites établis sont dépassés (douleur, souffrance, saignement, diminution de la prise alimentaire), l'animal sera euthanasié par dislocation cervicale dans un environnement éloigné, dans une pièce séparée de l'animalerie selon la réglementation en vigueur.

**9460** A partir du 1 janvier 2018, le passage à une alimentation 100% bio représentera un défi important pour les fabricants d'aliments car les besoins en acides aminés (AA) du porc devront être couverts seulement en combinant au mieux les ressources « bio » riches en protéines afin d'éviter des carences préjudiciables aux performances. En pratique, cela demande de connaître très finement la valeur protéique des matières premières riches en protéines (MPRP) biologiques. A ce jour, les MPRP bio disponibles sont principalement les tourteaux de soja, de tournesol (et dans une moins mesure le tourteau de colza) mais également les différentes variétés de pois (protéagineux et fourragers) ou des fourrages. Pour ces différentes matières premières, les teneurs en AA digestibles ne sont pas connues et/ou demandent à être précisées pour prendre en compte les spécificités (conditions agronomiques de production, procédés de trituration, etc.) imposées par la filière Bio. L'objectif de cet essai est d'étudier la valeur protéique de la farine de luzerne pour le porc en croissance. 5 régimes contenant respectivement 0, 5, 10, 15 et 20% de farine de luzerne seront utilisés. Les régimes obtenus seront testés sur 5 porcs dans un dispositif de type carré-latin. Deux animaux supplémentaires seront prévus dans le cas il nous faudrait remplacer des animaux dans le groupe initial des 5 porcs. Enfin d'expérience, les animaux recevront un régime dépourvu de protéines pour évaluer les pertes endogènes.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des acides aminés au niveau iléale et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Raffinement : l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digestats de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience.

Réduction : le nombre d'animaux (n=5 +2) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité. Dans notre essai, les mesures sont réalisées au niveau iléal et la variabilité entre les individus est réduite (grâce au dispositif expérimental en carré-latin).

**9461** La cécité est un des handicaps le plus redouté par la population. Selon l'OMS, en 2002, plus de 161 millions de personnes étaient atteintes de déficiences visuelles dont 15.5 millions de personnes en Europe et plus particulièrement chez les personnes âgées de plus de 50 ans. Avec le vieillissement de la population, le nombre de personnes atteintes de déficiences visuelles/cécité augmente. En Europe, ces déficiences visuelles sont principalement dues à des rétinopathies pigmentaires et à la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge). Dans ces deux pathologies, ce sont les photorécepteurs de la rétine qui sont affectés (dégénérescence). Depuis de nombreuses années, la prothèse rétinienne redonne l'espoir à ces patients de revoir un jour. Cette technologie ne permet pourtant pas d'apporter une solution aux patients ayant perdu la vue suite à une rétinopathie diabétique (atteintes des vaisseaux de la rétine) ou le glaucome (atteinte du nerf optique). L'utilisation d'un implant localisé dans le cortex visuel serait pour ces derniers une solution d'avenir.

Le présent projet vise à sélectionner des modèles d'implants qui seront conçues pour être implantées dans le cortex visuel.

L'étude portera sur deux aspects : la biocompatibilité des matériaux utilisés dans la fabrication des implants neuronaux ainsi que la forme géométrique de ces derniers (structure 3D pour augmenter la résolution et performance).

Nous utiliserons dans ce projet des rats normaux ainsi que des rats atteints d'une forme congénitale de dégénérescence rétinienne.

Au total 508 animaux seront nécessaires à ce projet.

L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet; la biocompatibilité et la performance in situ d'implants ne peut être testé sur des modèles de cellules en culture. Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les rats seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries et seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). Pour les procédures de chirurgies, la douleur sera prévenue par administration d'opioïdes en pré et post opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance plus adaptée selon les procédures afin de s'assurer de leur bien être.

**9462** Le projet s'intitule « Le rôle de la PI3K gamma dans les cellules dendritiques ». Les cellules dendritiques sont des cellules faisant la liaison entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ce sont les seules cellules capables d'activer les cellules T cytotoxiques destinées à éliminer les tumeurs et les cellules infectées par un virus. Des inhibiteurs de la PI3K gamma sont souvent utilisés en thérapie humaine lors des essais cliniques pour évaluer leur potentiel antitumoral ou anti-inflammatoire. Cependant, l'impact que peut avoir l'inhibition de la PI3K gamma sur la réponse immune adaptative amorcée par la cellule dendritique reste inconnu à ce jour. Nos données in vitro sur des lignées de cellules ressemblant aux cellules dendritiques montrent que la PI3K gamma est essentielle pour la fonction de présentation d'antigène. Pour confirmer ces résultats sur de vraies cellules dendritiques, in vitro et in vivo, la seule possibilité est d'utiliser des souris inactivées pour la PI3K gamma. Le nombre total de souris utilisées sera de 30. Il faut mentionner que les cellules dendritiques de type 1, impliquées dans l'immunité anti-tumorale sont très peu nombreuses (moins de 500000 par souris). Cependant, nous serions capables d'utiliser un nombre réduit des animaux grâce à des injections sous-cutanées de la cytokine Flt3L qui vont augmenter le nombre de cellules dendritiques. Ce protocole réduira le nombre de souris à utiliser de 100 à 30 animaux pour la totalité du projet. Nous prélèverons les rates et nous isolerons les cellules dendritiques en vue de tester leur

capacité de présentation d'antigène et leur migration. Des inhibiteurs de la PI3K gamma étant en essais cliniques pour le traitement des tumeurs, il est indispensable de savoir comment ces inhibiteurs vont changer la fonction de la cellule dendritique qui est essentielle pour l'activation de cellules T antivirales et antitumorales. Il est clair aujourd'hui que l'activité anti-tumorale des cellules T est cruciale dans le control de la maladie cancéreuse, ce qui explique le grand succès de l'immunothérapie. Donc, il est très important de comprendre comment la PI3K gamma régule les fonctions de la cellule dendritique pour éviter des associations thérapeutiques entre les inhibiteurs de la PI3K gamma et l'immunothérapie. On pourra ainsi éviter une diminution de l'efficacité de l'immunothérapie par les inhibiteurs de la PI3K. Les souris déficientes pour la PI3K gamma sont un modèle expérimental idéal d'un organisme traité avec un inhibiteur de la PI3K gamma.

Pour effectuer ce projet nous avons pensé au raffinement des conditions expérimentales, les souris seront anesthésiées avant les injections sous-cutanées, nous avons calculé le nombre minimal des expériences à réaliser pour être en mesure de faire des analyses statistiques des différences entre groupes par des tests d'hypothèse, comme le test Student. Les animaux seront gardés en permanence en groupe, dans leurs cages habituelles, avec un milieu enrichi, avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Le projet durera maximum 2 ans et son volet scientifique a été approuvé et financé par l'Agence Nationale de la Recherche. Pour ce projet, il n'y a pas la possibilité de remplacer les animaux par un modèle expérimental in vitro. Les modèles de différenciation des cellules dendritiques in vitro ne reproduisent pas assez fidèlement les cellules dendritiques formées dans l'organisme.

**9463** La NASH (stéatohépatite non alcoolique) est une pathologie chronique fréquente dans le monde occidental, elle est la résultante de l'association de plusieurs dysfonctionnements qui constituent le syndrome métabolique parmi lesquels les mécanismes déclencheurs sont pour la plupart identifiés (insulinorésistance, diabète de type 2, dyslipidémie et obésité). Cette pathologie est aussi rencontrée en association avec des infections virales (hépatite C chronique) ou après l'exposition à certains médicaments (chimiothérapie).

La NASH se caractérise par une accumulation de graisses dans le foie, accompagnée d'une inflammation qui entraîne la mort des cellules, avec ou sans fibrose (réparation des zones lésées par accumulation de protéines non fonctionnelles).

Cette pathologie étant multifactorielle les approches thérapeutiques sont nombreuses, cependant à ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH. L'évolution de la pathologie est lente et insidieuse, à ce jour elle ne peut être diagnostiquée chez l'homme que par la réalisation de biopsie hépatique, au laboratoire les modèles expérimentaux reproduisent chez l'animal la pathologie plus rapidement mais l'évaluation de l'efficacité des nouvelles molécules pour traiter cette maladie fait aussi appel à l'analyse histologique des tissus prélevés post-mortem.

Bien qu'une première phase de sélection des meilleurs composés soit effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, l'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits chez des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». De manière à réduire la durée des programmes de recherche, de limiter le nombre d'animaux engagés dans ces études in vivo et aussi pour mieux cibler les produits à évaluer (doses thérapeutiques efficaces plus finement ajustées) ; il est nécessaire de développer un outil pour ajouter un filtre supplémentaire à la sélection de nos molécules.

Sur la base de nos connaissances de ces mécanismes et des effets qu'ils produisent sur les niveaux d'expression de biomarqueurs circulants ou sur la signature d'expression de gènes cibles impliqués dans ces désordres métaboliques, notre objectif est de réaliser de manière préalable l'évaluation de l'activité in vivo de produits lors des tests de courte durée et sur des effectifs restreints d'animaux sains qui serait prédictive de leur efficacité sur la pathologie dans le modèle animal établi. Ainsi, nous évaluerons dans un modèle pathologique, plus sévère et de longue durée, l'efficacité des molécules, à des doses mieux ciblées, ayant montrées une preuve préalable de leur activité. Ceci contribuant à la réduction du nombre de procédure et donc d'animaux utilisés comme nous le rappelle la règle des 3R's.

L'évaluation finale de l'efficacité des molécules sera donc menée dans un modèle long terme de NASH induite par des régimes spéciaux (riche en graisse, en sucre) ou dans un modèle d'animaux mutants qui développent spontanément un syndrome métabolique (obésité, diabète, dyslipidémie). Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. Nous prévoyons l'emploi de 4700 souris et 3740 rats au cours de la durée couverte par ce projet.

Il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il sera euthanasié par une méthode adaptée le cas échéant. La douleur et l'inconfort liés à la pratique de certains gestes seront pris en charge par des méthodes antalgiques via notamment les anesthésiques locaux.

**9464** Les différences biologiques liées au sexe, induites par la génétique, l'épigénétique et les hormones, influencent la prévalence, l'âge d'apparition, la sévérité et l'évolution de nombreuses maladies ainsi que la réponse à de nombreux médicaments.

L'académie nationale de médecine indique notamment dans une information en 2016 intitulée « Parité en santé : La recherche scientifique et la médecine ne peuvent plus ignorer les différences biologiques entre les sexes » que les femmes font 2,5 fois plus d'accidents secondaires à la prise de médicaments.

La métabolomique est une technique de dosage qui permet de mesurer la concentration de plusieurs centaines de métabolites dans un tissu ou échantillons de cellules. Ceci permet d'obtenir un instantané, au moment exact du prélèvement, de l'état métabolique de ces cellules et des voies métaboliques empruntées.

Ce projet a pour objectif d'initier la cartographie métabolomique du dimorphisme sexuel chez la souris, c'est-à-dire d'effectuer des dosages en métabolomique sur 16 tissus de 11 organes de la souris (cerveau, cœur, gros vaisseaux et microcirculation, foie, 3 types de muscles squelettiques, rétines, nerfs optiques, peau, reins, poumons, intestin, thyroïde et plasma) chez des mâles et des femelles, afin d'évaluer l'impact, à l'échelle de l'organisme entier, du dimorphisme sexuel sur le métabolisme de la souris.

L'objectif est à terme de fournir un modèle qui permettra notamment de mieux appréhender ces différences chez l'Homme.

Pour cela, l'expérimentation sera menée sur 240 souris réparties dans 6 lots de 40 (20 mâles, 20 femelles) afin de déterminer l'impact de l'âge et des hormones sexuelles sur les différences observées. Ces six lots seront répartis en : un lot contrôle (étudié à 3 mois), un lot âge (étudié à 15 mois), deux lots gonadectomisés (un étudié à 3 mois, l'autre à 15 mois), et deux lots contrôles pour la chirurgie (lots « Sham », qui subiront une intervention chirurgicale similaire mais sans retrait des gonades, pour s'affranchir de l'impact lié à l'effet de la chirurgie en elle-même), un à 3 mois, l'autre à 15 mois. La composition précise des lots est détaillée dans le paragraphe 3.3.2 : description du projet. Le protocole de recherche a été fondamentalement conçu pour assurer le respect de la règle des 3 R :

Réduire le nombre d'animaux en utilisant des tests statistiques adaptés afin d'assurer une puissance statistique optimale avec un faible nombre d'individus par lot. Raffiner : par l'enrichissement des cages (habitats pour souris dans les cages...) et du lieu de vie (musique dans la pièce de vie des souris).

La surveillance quotidienne par une équipe qualifiée du bien être des animaux sera réalisée, selon des critères objectifs listés dans la grille de surveillance fournie en annexe (fichier « Points limites.pdf ») permettant de juger l'état de santé physique (perte de poids, signes d'altération de l'apparence) et mentale (comportement, réponses comportementales aux stimuli) des souris. Cette grille permettra d'attribuer un score pour chacun de ces paramètres à chaque souris, allant de 0 (absence de signes d'altération) à 3 (signes d'altération sévères). Toute souris évaluée à un score

de 3 pour au moins un de ces paramètres sera immédiatement euthanasiée. Ces points limites sont détaillés dans le paragraphe 3.4.13 : points limites.

Remplacer : le modèle animal choisi constitue la meilleure alternative pour l'étude.

En effet : la souris est d'assez petite taille pour permettre un élevage d'un nombre suffisant d'individus pour assurer la puissance statistique des tests réalisés, et d'assez grande taille pour permettre une dissection rapide des tissus étudiés en un temps assez court pour limiter la dégradation prématurée des tissus prélevés. Le génotype des souris C57BL/6J est connu est très constant, minimisant les variations entre individus qui peuvent générer du bruit dans les données métaboliques. Enfin, la souris C57BL/6J est un modèle animal particulièrement bien connu dans le domaine de la recherche et très utilisé en recherche pré-clinique, les résultats pourront donc être facilement corrélés à la littérature et pourront trouver une application en recherche fondamentale et pharmacologique, notamment. Les critères exacts du choix de l'espèce sont détaillés dans le paragraphe 3.4.3 : pertinence de l'espèce choisie.

**9465** La mort subite et inattendue liée à l'épilepsie (SUDEP) représente une cause majeure de décès prématuré chez les 15 à 20 millions de patients épileptiques pharmaco-résistants. Les jeunes adultes sont les plus touchés (incidence d'environ 0,5 % par an). Hormis l'optimisation du traitement antiépileptique, aucun traitement préventif spécifique des SUDEP n'est disponible.

Bien que les mécanismes physiopathologiques exacts de la SUDEP demeurent inconnus, les données expérimentales et cliniques suggèrent que la plupart résultent d'une dysfonction respiratoire en lien avec une crise, évoluant vers l'apnée terminale, puis l'arrêt cardiaque. Avec la répétition des crises, des altérations chroniques de la régulation respiratoire se mettent également en place.

Malgré l'importance des données obtenues dans les modèles animaux disponibles, certains points limitent la compréhension des mécanismes conduisant à la SUDEP ainsi que l'identification des patients à haut risque de SUDEP et donc, les développements thérapeutiques spécifiques :

- les modèles animaux dits de SUDEP modélisent exclusivement un arrêt respiratoire survenant au cours d'une crise tonique unique (induisant une raideur et une contraction des membres) induite chez un animal ne souffrant pas d'épilepsie. L'impact de la répétition des crises comme dans la pathologie humaine n'est donc pas modélisé.

- parmi les rats souffrant d'épilepsie chronique, par exemple après injection de pilocarpine, seule une partie présentent des troubles respiratoires chroniques mais aucun décès spontané n'a été constaté. En effet, ce modèle animal induit spontanément des crises cloniques (présence de spasmes des membres et non de raideur) mais pas de crises toniques. Une meilleure compréhension de la physiopathologie des SUDEP et le développement de thérapeutiques préventives imposent de s'appuyer sur une modélisation intégrant ces divers aspects. A ce jour, seule une approche chez l'animal peut permettre de disposer de modèles intégrés répondant à ce besoin, l'objectif du projet étant de permettre d'améliorer cette modélisation.

L'objectif de cette étude pilote de preuve de concept est donc d'évaluer si ces limites de modélisation de la SUDEP peuvent être dépassées via l'induction d'une crise tonique d'origine hippocampique dans un modèle d'épilepsie chronique, et spécifiquement si :

1. des crises toniques induites par la stimulation de l'hippocampe ventral induisent un arrêt respiratoire fatal,

2. ceci est plus fréquemment observé chez les animaux présentant des troubles respiratoires chroniques (différenciés des rats n'ayant pas de troubles respiratoires par l'absence d'hypersignal IRM dans les régions antérieures du cerveau),

3. une administration d'oxygène peut permettre une récupération respiratoire secondaire.

Nous utiliserons un modèle d'épilepsie induite chez le rat Sprague Dawley. Après un état de mal épileptique (EME) induit par pilocarpine et une période de remaniements cérébraux, les rats présentent des crises spontanées. Ce modèle permet de reproduire les troubles et symptômes observés chez les patients épileptiques.

A la 5ème semaine post-EME, quand l'épilepsie est installée, une IRM cérébrale sera réalisée pour identifier les rats présentant des troubles respiratoires de ceux indemnes de cette comorbidité. Compte tenu de données antérieures obtenues au laboratoire, une proportion de 40% de rats

présentant des troubles respiratoires est attendue. Ces données seront utilisées pour répondre au point n°2.

A la 7ème semaine post-EME, une crise tonique sera induite chez tous nos rats par stimulation électrique de l'hippocampe (par le biais d'une électrode de stimulation implantée). La crise tonique sera validée à la fois sur le plan clinique et sur le plan électroencéphalographique (EEG). La survenue d'une apnée fatale sera évaluée et permettra de répondre au point n° 1. Si ceci survient de manière reproductible chez 3 animaux successivement, une évaluation de l'impact d'une oxygénothérapie sans intubation trachéale sur la récupération respiratoire sera réalisée après un délai décroissant d'arrêt respiratoire chez les animaux suivants dans le but de répondre au point n°3.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux

Cette étude pilote prévue sur 6 mois nécessitera l'utilisation de 20 rats : cet effectif a été déterminé sur la base de la fréquence de survenue de troubles respiratoires dans le modèle EME (40%) et en cherchant à minimiser au maximum le nombre d'animaux soumis à une crise induite électriquement. Durant les 15 jours suivant l'EME, l'état général des animaux sera observé pluri-quotidiennement. Des points d'appel, tels que prostration, dos voûté ou perte de poids seront surveillés. Les animaux seront alimentés avec des croquettes ramollies et un massage abdominal quotidien sera pratiqué afin de les aider à retrouver la motilité abdominale affectée. Ces raffinements permettent à l'animal de retrouver un bon état général rapidement. Cette récupération sera évaluée par le biais d'une grille de cotation.

De même, lors de la chirurgie d'implantation de l'électrode intra-cérébrale, une couverture anesthésique et analgésique appropriée sera utilisée et en période de réveil post-chirurgicale, les animaux seront rigoureusement surveillés.

Les animaux non utilisés pour ce projet seront réaffectés dans d'autres projets de l'équipe

Si ce projet montre que cette approche permet de modéliser plus efficacement la SUDEP, des études visant à spécifiquement évaluer les mécanismes neurobiologiques mis en jeu dans la survenue de l'arrêt respiratoire seront envisagées.

**9466** L'obésité et le surpoids sont de plus en plus fréquents dans nos sociétés industrialisées. Des données issues d'études épidémiologiques indiquent que 15% des français, soit presque 7 millions d'individus sont obèses (Enquête ObEpi-Roche 2012). Les pathologies associées les plus communément décrites sont des maladies cardiovasculaires et le diabète, qui, au-delà de l'impact sur le taux de mortalité, représentent un défi majeur de santé publique en terme de coût financier. La cause principale de cet excès de masse grasse est une mauvaise alimentation, trop riche, non compensée par des activités physiques. Plusieurs approches sont tentées dans divers laboratoires pour endiguer ce qui est décrit comme une épidémie mondiale. L'une d'entre elles pourraient résider dans l'apport d'aliments ou de compléments alimentaires enrichis en extraits de végétaux ou d'algues.

Afin de démontrer l'efficacité de ces extraits sur le métabolisme (de tels produits ont déjà été testés dans le domaine de la cognition), une étude in vitro sur des adipocytes sera menée en parallèle à notre étude in vivo. Ces deux études, complémentaires, permettront de recueillir des informations importantes sur l'efficacité et le mode d'action d'extraits naturels d'algues. L'approche in vivo sera réalisée sur des souris mâles C57BL/6J nourries consécutivement par un régime standard pendant 4 semaines puis par un régime enrichi en graisses pendant 4 semaines supplémentaires pour mimer le développement du tissu adipeux et la mise en place d'un diabète. Les extraits naturels seront administrés avant et pendant le régime enrichi en graisses afin de se positionner sur un versant préventif. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet seront menées en parallèle à des investigations in vitro sur adipocytes, mais elles ne peuvent cependant pas être totalement remplacées par les cultures cellulaires. En effet, ces dernières n'amènent pas le même niveau d'information (ici modification de la physiologie est à analyser). D'autre part, des études réalisées dans un domaine différent de métabolisme, n'ont pas entraîné de souffrance ou de stress particulier aux animaux inclus dans ce protocole. Par ailleurs, l'utilisation de modèles murins est un prérequis pré-clinique à une étude à visée préventive ou thérapeutique chez l'Homme. Pour mener à bien cette étude (test de deux extraits seuls à deux doses différentes, test de leur combinaison à la dose la plus faible en parallèle au test avec le diluant des extraits), 6 groupes de 10 animaux seront nécessaires. Les analyses statistiques non paramétriques de type Mann-Whitney ou ANOVA à 2 facteurs avec



test post hoc associé seront appliquées selon la nature des investigations menées. Les animaux seront manipulés par des gens compétents et formés, selon un plan expérimental bien défini, dans des locaux agréés. Leur bien être sera suivi de manière quotidienne par des zootechniciens ou des membres de l'équipe porteuse de ce projet et ce sous la supervision de la Structure du Bien Etre Animal.

Cette étude s'insère dans le cadre d'un programme européen H2020 de développement d'ingrédients pour les compléments alimentaires.

**9467** Ce projet permettra d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements anti-infectieux contre les infections urinaires.

Ces infections touchent un nombre important de femmes (10%) et d'hommes âgés sous forme de cystite aiguë, qui peuvent devenir chroniques (au moins 3 épisodes par an) chez 25 % des patients. Les traitements habituellement utilisés sont des antibiotiques, avec l'apparition de résistances qui limitent les choix thérapeutiques. La recherche et le développement pharmaceutique sont donc très actifs actuellement pour comprendre les mécanismes de chronicité infectieuse et pour trouver des solutions thérapeutiques ou préventives à cette pathologie importante.

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. En effet, les tests in vitro à dispositions pour les anti-infectieux, effectués préalablement pour valider l'intérêt d'une cible thérapeutique, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes. Il est donc important de disposer d'un modèle animal d'infection urinaire permettant d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements.

Ce projet s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*). Les animaux seront infectés au niveau de la vessie avec une souche bactérienne classiquement retrouvée lors d'infections urinaires (*E. coli*). Différents traitements seront ensuite testés sur différents groupes d'animaux afin de tester leur efficacité.

Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 1900 souris pour l'évaluation de l'efficacité 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 (tests bactériologiques). Il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle in vitro d'infection urinaire mimant le système uro-génital complet de l'humain.

- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé incluant groupe contrôle négatif et groupe control positif (avec antibiotique de référence), le nombre d'animaux est réduit à son minimum pour chaque groupe. De plus, le projet inclut, une évaluation en imagerie non invasive (tomographie de fluorescence). A terme, cette procédure permettra de réduire le nombre d'animaux.

- Raffinement : Evaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal), enrichissement du milieu dans les cages et utilisation de techniques d'imagerie innovantes permettant de suivre au mieux l'évolution de la pathologie et de stopper rapidement tout signe de souffrance et de douleur.

**9468** La consommation d'alcool est un facteur de vulnérabilité pour développer des maladies psychiatriques entre autres liées au stress. Le syndrome de stress post-traumatique (PTSD) est un trouble d'anxiété qui se développe chez des personnes qui subissent ou sont témoins directs d'un événement traumatisant sévère. Parmi les facteurs qui peuvent prédisposer au PTSD, la consommation chronique d'alcool pourrait jouer un rôle majeur.

Pour vérifier cette hypothèse et étudier les conséquences de la consommation d'alcool au niveau comportemental et neurochimique, le projet a comme objectif de modéliser les effets de l'alcool dans des protocoles de peur acquise chez la souris. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes

psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux.

Pour cela nous utiliserons des souris de laboratoire adultes âgées de 8 semaines (500 sur 3 ans). Les souris seront traitées avec de l'alcool puis exposées à une expérience stressante. Nous mesurerons leur anxiété et leur comportement de peur, et le comparerons avec des souris n'ayant pas reçu de l'alcool. Les cerveaux de ces mêmes souris seront prélevés afin d'effectuer des analyses neurochimiques et de déterminer des biomarqueurs de cette maladie. Une partie des souris sera également traitée par une molécule en développement en comparaison avec un antidépresseur connu, afin d'évaluer l'efficacité potentielle de ce nouveau traitement dans la prise en charge du PTSD.

Les analyses comportementales seront effectuées à l'aide de matériels et de logiciels dédiés qui permettent d'automatiser les procédures et d'avoir une meilleure reproductibilité des données et de diminuer le nombre de souris requis. Les analyses neurochimiques seront réalisées chez les souris dont le comportement a été analysé, afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux.

Les souris seront observées quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur ou de souffrance chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques.

Au terme de ce projet nous espérons déterminer les interactions moléculaires entre l'éthanol et la mémoire traumatique afin de mieux prendre en charge les patients atteints de PTSD.

**9469** Ce projet porte sur l'étude des métastases dans le cancer du sein. La détection des métastases est un point crucial pour la prise en charge des patients et le choix des traitements.

Ce projet est donc construit avec un triple objectif : 1/ Mettre en place de nouveaux traceurs radioactifs d'imagerie pour la détection précoce des métastases du cancer du sein, 2/ évaluer l'action de ces traceurs pour le suivi de l'apparition de métastase 3/ évaluer les effets de nouveaux traitements.

Le cancer du sein sera induit chez la souris par injection de cellules cancéreuses au niveau de la glande mammaire. Ces cellules ont été modifiées pour produire de la lumière et peuvent donc être suivies dans l'animal. Ces cellules sont connues pour former une tumeur au niveau de la glande mammaire puis elles forment des métastases dans différents organes notamment le cerveau, les os, les poumons et le foie en 6 semaines.

Une première étape préliminaire servira à mettre en place les modèles chez la souris afin de bien les caractériser pour les expériences suivantes.

Par la suite, nous allons évaluer 2 nouveaux traceurs ; le traceur 1 qui a des propriétés d'imagerie des métastases et le traceur 2 qui a des propriétés d'imagerie combinées à une action thérapeutique. L'efficacité de ces 2 traceurs sera comparée à un traceur commercial de référence

Pour la totalité du projet 134 souris seront nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie est répétée à différents temps et permet de réduire le nombre d'animaux d'autant. De plus, le design choisi permettra d'éviter de multiplier les expérimentations identiques et de réaliser des validations successives. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux sera réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire au maximum l'inconfort potentiel. L'étude de la formation et la diffusion des métastases rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement in vivo.

**9470** Les infections bactériennes pulmonaires posent des problèmes thérapeutiques car certaines souches sont résistantes aux antibiotiques et ceux-ci diffusent mal dans les sites infectés.

Le développement d'antibiotiques à nouveaux modes d'action et d'administration est limité. Le développement de nouveaux types de traitements antibactériens apparaît donc comme une alternative pour économiser l'arsenal antibiotique et constituer un dernier recours face aux bactéries

multi-résistantes. Leur administration par voie pulmonaire permettrait leur concentration dans le poumon qui est un organe difficilement accessible par la voie classique intra veineuse.

Un nouveau traitement antibactérien a été développé par un collaborateur privé. Il est efficace contre plus de 600 souches d'une bactérie opportuniste connue pour être multi-résistante et responsable d'infections respiratoires acquises sous ventilation mécanique, c'est à dire lorsque l'état du patient a nécessité sa mise sous respirateur artificiel après anesthésie et intubation.

Le test d'efficacité de ce nouveau traitement a déjà été réalisé chez la souris.

L'étude de l'efficacité thérapeutique et de la pharmacocinétique du médicament administré par voie pulmonaire, dans le modèle porcin a été autorisée dans une DAP précédente. Cependant les animaux ne sont pas hébergés dans le même établissement utilisateur (EU) que celui où est effectuée le protocole de recherche.

Afin de diminuer le stress des animaux, ceux-ci sont anesthésiés afin d'être sortis de leurs hébergements et transportés dans la salle de chirurgie.

L'objectif de cette demande est de décrire l'anesthésie mise en place pour transporter les animaux entre leur lieu d'hébergement et la salle de chirurgie ainsi que le traitement antibiotique mis en place afin que l'infection induite soit due uniquement à la bactérie administrée.

Le nombre de porcs concernés par cette demande est de 36.

Ce nombre a été déterminé de façon à respecter la règle des 3R.

Remplacer : le modèle porc est judicieusement utilisé dans des protocoles de recherche, souvent en complément d'études in vitro qui ne permettent pas de modéliser un organisme entier (par exemple réponse et devenir dans l'organisme d'une molécule thérapeutique)

Réduire : le nombre de porcs a été déterminé afin de sélectionner un nombre d'individus nécessaire pour mener à bien une étude nécessitant 36 animaux sur 2 ans.

Raffiner : Les animaux sont élevés ensemble (enrichissement social) dans un local adapté (conforme aux normes en vigueur) avec des ballons et chaînes. L'anesthésie est mise en place afin de diminuer le stress du au transport entre l'hébergement et la salle de chirurgie. Les molécules utilisées (kétamine 20mg/kg et xylazine 2mg/kg) permettront de potentialiser la phase d'induction de l'anesthésie prévue pendant le protocole expérimental.

**9471** Les neuropathies périphériques sont une atteinte du système nerveux somatosensoriel dont les causes, nombreuses, concernent des maladies telles le diabète, le cancer ou l'exposition à des agents chimiques toxiques tels que les chimiothérapies anti-cancéreuses. Elles sont observées aujourd'hui chez 8 % de la population et constituent de ce fait un enjeu clinique important. La neuropathie est une des complications les plus fréquemment observées chez les personnes souffrant d'un diabète évoluant depuis plusieurs années. Les douleurs liées à la dégénérescence des nerfs sensoriels sont ressenties aux extrémités des membres. Il s'agit de douleurs diffuses musculaires et névralgiques (déchirures, broiement), des sensations de brûlures, des paresthésies (fourmillement, jambes sans repos), des engourdissements, dont l'intensité est extrêmement invalidante. Ces neuropathies se développent aussi dans la majorité des traitements chimiothérapeutiques anti-cancéreux, conduisant dans de nombreux cas à limiter, voire interrompre leur utilisation, avec un impact non négligeable sur le contrôle tumoral et la survie. Les traitements thérapeutiques actuels largement insuffisants rendent nécessaire l'identification de nouvelles thérapies pour prévenir et/ou traiter la neuropathie.

Des modèles animaux de neuropathies périphériques générées par le diabète, par des cancers ou des traitements par des agents de chimiothérapie existent et ont permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces perturbations sensorielles. Actuellement, les traitements utilisés en clinique humaine pour soulager ces douleurs ont été mis au point et validés dans ces mêmes modèles. Les méthodes alternatives qui permettraient d'éviter les études sur l'animal sont inexistantes, la complexité des mécanismes mis en jeu dans le développement de la sensibilisation des nerfs et la chronicité de cette pathologie rendent incontournable le recours à ces modèles animaux.

Le projet décrit dans cette demande a pour but d'évaluer la sensibilité douloureuse de l'animal (sensibilité au toucher et à la température) dans différents modèles de neuropathies périphériques, afin de caractériser finement ses modalités et de tester de nouvelles thérapies anti-douleurs. En

parallèle, une analyse biochimique du contenu tissulaire des zones concernées, associée à une approche innovante par imagerie sur animal entier sera utilisée, afin de caractériser de nouveaux marqueurs biologiques de la neuropathie.

Ce projet concerne 800 souris et 320 rats sur une période de 5 ans pour l'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules analgésiques.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité ex vivo.
- Réduction des animaux : le design de l'étude permet à chaque animal de suivre un traitement répété au cours du temps si nécessaire et d'être, pour chaque traitement effectué, son propre contrôle, réduisant ainsi le nombre d'individus par groupe.
- Raffinement : l'évaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal), et l'enrichissement du milieu d'hébergement seront contrôlés.

**9472** La « NASH », ou stéatohépatite non-alcoolique, est une maladie du foie qui associe une accumulation de graisse dans le foie, une inflammation et une dégénérescence des cellules hépatiques. Une fois installée, la maladie s'accompagne d'un risque de cirrhose élevé, un état au cours duquel les fonctions hépatiques se désorganisent pour finalement s'avérer insuffisantes. Dès lors, la NASH peut évoluer vers des cancers du foie.

Partout dans le monde, le nombre de cas de NASH est en constante augmentation, corrélé à la pandémie de diabète et d'obésité. Mais aujourd'hui, aucun traitement n'existe pour soigner cette maladie. De ce fait, un grand nombre d'études scientifiques ayant pour but de comprendre la progression de la NASH se déroule à travers le monde. Cependant les modèles in vivo existants restent limités et ne montrent pas toutes les caractéristiques cliniques observées chez les patients NASH. De ce fait, l'importance de développer un modèle expérimental permettant de modéliser le développement de la maladie et d'identifier des cibles pour le traitement de cette pathologie devient prioritaire.

Récemment, il a été décrit que des souris placées à neutralité thermique (30°C) et nourries avec un régime riche en calories, présentaient une accélération et exacerbation des symptômes de la NASH. Les procédures expérimentales utilisées dans le projet ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Il est à noter que nous effectuons d'ores et déjà de nombreuses expérimentations liées au projet dans des modèles cellulaires, nous permettant d'évaluer précisément certains mécanismes biologiques impliqués. Cependant, nous sommes dans l'obligation de déterminer la pertinence physiologique de nos observations cellulaires dans un organisme entier. Par ailleurs, l'utilisation de modèles murins est aussi un prérequis pré-clinique à une étude à visée thérapeutique chez l'Homme.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins par les zootechniciens et les méthodes utilisées (par des expérimentateurs formés et compétents) sont les plus appropriées pour réduire au minimum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Ceux-ci seront hébergés en groupe dans un milieu pouvant être plus ou moins enrichi (papier, tunnel, igloo, ...). Enfin, un suivi quotidien des animaux sera réalisé en coordination avec les zootechniciens. L'objectif de ce projet est simple : il s'agit d'une étude pilote visant à confirmer l'induction de la stéatose hépatique chez la souris C57Bl6/J mâle (2 groupes, n=6/groupe,) dans des conditions de thermoneutralité et à déterminer la faisabilité technique d'un tel protocole.

Cette étude pilote va permettre de définir les paramètres techniques et scientifiques afin de pouvoir affiner les protocoles pour les futures expérimentations utilisant ce modèle animal et de définir avec plus de précision le nombre d'animaux nécessaire aux observations envisagées, ceci pour être conforme aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

**9473** L'hyperacousie est une pathologie qui affecte une part significative de la population générale, elle se caractérise comme une hypersensibilité à des sons de la vie courante. Pourtant, les données restent encore limitées comparées à d'autres pathologies de la sphère auditive. Il semble intéressant de se pencher sur la transmission de messages acoustiques en conditions d'hyperacousie pour identifier

des changements qui pourraient survenir. L'audition peut être mesurée en utilisant des méthodes objectives non invasives. Ces méthodes sont basées sur l'enregistrement de l'activité électrique de divers relais de la voie auditive. Il s'agit de mesurer les potentiels auditifs, ceux-ci reflètent l'activité de structures nerveuses impliquées dans le codage des sons. Cette mesure est réalisée par l'insertion d'une sonde dans l'oreille et d'électrodes sous la peau. Cela permet d'évaluer le potentiel du nerf auditif et le fonctionnement des noyaux relais du tronc cérébral.

Expérimentalement, le salicylate de sodium (SS), ingrédient actif de l'aspirine, est connu depuis longtemps pour induire une perte auditive temporaire et des acouphènes aigus chez les humains et les animaux et a servi de modèle extrêmement utile pour étudier les mécanismes neuronaux et biologiques sous-jacents des acouphènes et l'hyperacousie. Ce modèle est simple à mettre en place puisqu'il consiste à injecter par voie intrapéritonéale une forte dose de salicylate de sodium. Alors que de fortes doses de salicylate sont connues pour induire des acouphènes dans des modèles animaux, des études plus récentes indiquent que le salicylate augmente également l'amplitude du réflexe de sursaut acoustique, les résultats étant interprétés comme des signes d'hyperacousie mais aussi liés au stress.

Le réflexe acoustique de sursaut est provoqué par un son fort et inattendu. Il s'agit d'un mécanisme de protection qui se traduit par un clignement des yeux, un haussement des épaules et une contraction des muscles du tronc. Chez l'Homme, il intervient entre 30 et 50 ms après le bruit. Chez le rat, une injection de 250 mg/kg de salicylate induit une augmentation de l'amplitude du réflexe acoustique de sursaut et particulièrement à 80, 90 et 100 dB SPL (Sound pressure level, niveau de pression acoustique efficace appliqué à l'oreille). Elle est interprétée comme traduisant un comportement lié à de l'hyperacousie. L'étude permettra de définir si la perte auditive décrite dans la littérature est bien avérée ou s'il s'agit d'une modification des voies de transmission, cela expliquerait l'augmentation du réflexe acoustique par l'augmentation de la sensibilité auditive du rat.

Pour réaliser cette étude, nous aurons 2 groupes d'animaux comprenant chacun 10 animaux : 1 groupe contrôle sérum physiologique et 1 groupe recevant le salicylate de sodium.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests (le salicylate de sodium induit de l'hyperacousie dans 50 à 70% des cas) ou qui présenteraient des pertes auditives dues à la présence d'otite, mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Aucune méthode alternative ne permet de remplacer ce protocole. Il est nécessaire de réaliser ces études in vivo, car l'intégration du son implique de nombreuses régions du système nerveux central. Au total 20 rats seront utilisés dans ce projet. Pour évaluer l'audition, nous réalisons les tests fonctionnels sur l'animal anesthésié. Ils seront euthanasiés à la fin des procédures par overdose d'anesthésie.

**9474** La cornée est un tissu composé de 3 couches. De la surface antérieure vers la postérieure, nous avons l'épithélium, ensuite le stroma et enfin l'endothélium. Le stroma est composé de kératocytes noyés dans du collagène organisé en lamelles permettant sa transparence.

Il est possible de découper au sein du stroma de fines lamelles d'une cinquantaine de microns d'épaisseur. On peut par la suite supprimer toutes les cellules présentes dans ces lamelles stromales afin d'en faire un tissu constitué à 100% de collagène. Ces lamelles decellularisées pourraient avoir un intérêt pour le bioengineering mais aussi pour la thérapie de maladies cornéennes.

Le but de ce projet est d'étudier la tolérance d'une lamelle de stroma cornéen humain dépourvue de cellule, insérée dans la cornée d'un lapin.

Ceci permettrait de connaître l'immunogénicité et la toxicité éventuelle de ces lamelles. Il est attendu que ces 2 phénomènes soient négligeables compte tenu du procédé de fabrication et des tests in vitro déjà réalisés.

Ces connaissances sont indispensables dans le processus de transfert de ces lamelles dans un cadre thérapeutique chez l'homme.

La cornée de lapin est similaire à celle de l'homme au niveau de l'anatomie et de l'histologie.

Au total 9 lapins seront nécessaires pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs.

Ce nombre doit obligatoirement être mis en œuvre afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme.

Le protocole est pensé afin de limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale durant la pose des lamelles stromales). Un traitement antalgique systématique sera administré en post-op.

Il est à noter qu'en pratique chez l'homme cette chirurgie n'est pas considérée comme douloureuse et est effectuée sous anesthésie locale uniquement par collyre. Les effets indésirables sont similaires à ceux de l'Homme (oedème cornéen, néovascularisation, rejet) et sont rigoureusement suivis et contrôlés dans un tableau de suivis des animaux.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions, mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Un traitement antalgique et anti inflammatoire sera administré 2 et 7 jours post-opération.

Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage règlementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages), dans un environnement enrichi (divers jeux adaptés aux besoins naturels de l'espèce).

Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

**9475** Ce projet porte sur l'étude de la fibrose pulmonaire qui se caractérise par une modification de la structure du tissu pulmonaire qui devient plus rigide. Elle résulte de l'accumulation excessive de protéines comme le collagène et mène à des défauts de fonctionnement des poumons. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode permettant un diagnostic précoce et peu de traitements disponibles car les mécanismes menant à la fibrose sont peu connus.

Ce projet est donc construit avec un triple objectif : 1/ Mettre en place de nouveaux traceurs d'imagerie pour le diagnostic précoce non-invasif de la fibrose pulmonaire, 2/ évaluer l'action de ces traceurs pour le suivi de l'efficacité de traitements anti-fibrose et enfin 3/ évaluer les effets de nouveaux traitements. La fibrose pulmonaire sera induite chez le rat et la souris par administration (sous anesthésie) de bléomycine. Ce modèle entraîne une fibrose qui commence à se déclarer une semaine après l'injection (phase précoce) jusqu'à 4 semaines (phase tardive).

Dans une première étape, la faisabilité de l'imagerie de la fibrose pulmonaire avec 4 traceurs distincts sera démontrée par une étude préliminaire (et des validations in vitro) sur un petit nombre d'animaux atteints de fibrose (n=3 groupe).

Par la suite, la validation des traceurs se fera sur un plus grand nombre d'animaux (n=8 par groupe) à 2 stades de l'évolution de la fibrose ; un stade précoce (10 jours après injection de bléomycine) et un stade tardif (28 jours après injection de bléomycine). Cette première étape permettra ainsi d'identifier la pertinence de l'imagerie in vivo pour la détection de la fibrose pulmonaire suivie par imagerie comparé aux analyses classiques.

La seconde étape de ce projet permettra d'évaluer l'action des traceurs validés lors de la première étape pour le suivi de l'efficacité de deux composés anti-fibrose déjà existants (pirfenidone et nintedanib). Les animaux atteints de fibrose recevront les traitements et subiront des imageries répétées (1 par semaine) afin de suivre l'évolution de la fibrose comparée à des animaux non traités. La troisième étape permettra d'évaluer l'efficacité de quatre nouveaux traitements distincts. Les animaux recevront de la bléomycine puis les différents traitements et subiront des imageries répétées (1 par semaine) afin d'évaluer leur efficacité comparée à un placebo.

Pour la totalité du projet 316 souris et 316 rats seront nécessaires.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude classique qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie est répétée à différents temps et permet de réduire le nombre d'animaux d'autant. De plus, le design choisi permettra d'éviter de multiplier les expérimentations identiques et de réaliser des validations successives. Le raffinement a été pris en compte : la totalité des procédures impliquant les animaux (induction de fibrose, imagerie) sera réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante pour réduire au maximum l'inconfort potentiel. L'étude de la

structure pulmonaire rend la règle de remplacement difficilement applicable puisqu'il est nécessaire de l'étudier dans son environnement in vivo.

**9476** Le laser femtoseconde est un nouvel outil chirurgical qui permet aujourd'hui de découper le segment antérieur. L'utilisation d'une telle technologie ne produit pratiquement aucun effet délétère persistant. Il permet des chirurgies précises et est simple d'utilisation, offrant ainsi de nouvelles perspectives dans la chirurgie ophtalmologique.

L'utilisation de laser femtoseconde en chirurgie ophtalmologique dans des interventions du segment antérieur de l'oeil permet d'améliorer la sécurité des techniques, de diminuer le temps de chirurgie et d'améliorer les résultats postopératoires avec une récupération visuelle rapide et prédictible.

Le but de ce projet est d'étudier la sécurité et l'efficacité d'un prototype de laser femtoseconde chirurgical ophtalmologique comme outil de chirurgie de la cataracte et de l'astigmatisme du segment antérieur. Ce laser permettra d'apporter une reproductibilité dans les chirurgies de la cataracte et de l'astigmatisme aujourd'hui inégalée.

Le segment antérieur (cristallin et cornée) du lapin est très proche de celui de l'homme au niveau de l'anatomie et de l'histologie.

Au total, 16 lapins seront utiles pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs.

Ce nombre doit obligatoirement être mis en œuvre in vivo afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme.

Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale avec analgésie pendant la chirurgie ainsi que pour les suivis hebdomadaires).

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions, mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie).

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

**9477** Contexte scientifique :

De nombreuses pathologies cardiovasculaires impliquent directement un trouble du système nerveux contrôlant la pression artérielle et les contractions cardiaques. Ce système repose sur deux systèmes antagonistes ; le système vagal et le système sympathique. Une activité sympathique exacerbée et une activité parasympathique effondrée peuvent ainsi conduire à l'établissement progressif d'une cardiomyopathie telle que l'insuffisance cardiaque ou l'hypertension artérielle. A l'inverse, un remodelage (dénervation) du système nerveux autonome sympathique ou parasympathique est connu dans de nombreuses pathologies telle que le syndrome cardiaque au cours du diabète. Une meilleure connaissance de la mise en place du système nerveux autonome sympathique et parasympathique cardiaque, est donc primordiale pour la compréhension de l'implication de ce système au cours des pathologies. Nous avons montré que le facteur de transcription Meis 1 est impliqué dans la formation du système nerveux autonome au cours du développement et en particulier du système nerveux sympathique. La perte de Meis 1 conduit à une perte de neurones sympathiques et à des arythmies cardiaques. Pour l'heure, aucune donnée n'est disponible sur le rôle de Meis 2 dans la régulation par le système nerveux autonome de la fonction cardiovasculaire.

Hypothèse :

Au vu des données bibliographiques, et d'après nos résultats préliminaires, nous formulons l'hypothèse que Meis2 participe à la mise en place de l'innervation du système cardio-vasculaire par le système nerveux autonome au cours du développement embryonnaire et à des stades périnataux. L'absence de Meis2 pourrait ainsi avoir des conséquences fonctionnelles importante sur la régulation du système cardiovasculaire sans induire de malformation cardiaque.

Objectif et résultats attendus :

L'objectif est de caractériser comment, où et quand est exprimé le facteur de transcription Meis 2 pour le corréler à la fonction électrique cardiaque et de la pression artérielle chez des animaux sains et des animaux qui n'expriment pas la protéine Meis 2. Il n'existe pas de méthode alternative in vitro ou in silico permettant de répondre à nos questions scientifiques, c'est pourquoi cette étude sera réalisée sur un modèle murin (105 animaux seront nécessaires pour l'ensemble de l'étude). Les expériences seront réalisées avec la préoccupation de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (1 animal sera enregistré à la fois par télémétrie pour l'ECG, pour la mesure de la pression artérielle, et pour l'analyse immuno-histologique) et en prenant soin de réduire au maximum la douleur (anesthésie/ analgésie au besoin), dans des locaux agréés et par des personnes autorisées pour l'expérimentation animale (Niv I et chirurgie).

**9478** La grande similitude entre les gènes de rat et les gènes humains pour des maladies connues, l'abondante littérature, la taille de son cœur ainsi que l'existence des rats-modèles knock-out font de lui un bon modèle pour les nouvelles recherches pré-cliniques et thérapeutiques surtout dans le domaine cardiovasculaire. Notre établissement développe depuis quelques années la transgénèse chez le rat. Ainsi, de nouveaux projets sont amenés à être réalisés chez cette espèce.

Nous souhaitons dans un premier temps avoir des données cardiaques standards de différentes souches de rats afin de les comparer avec ceux de la littérature. Nous aurons ainsi un catalogue de données et d'images pour les chercheurs. Pour cela, nous réaliserons de l'échographie cardiaque qui est un examen permettant d'étudier l'anatomie et la fonction cardiaque. Cet examen sera couplé à un électrocardiogramme (ECG) permettant de faire un tracé de l'activité électrique du muscle cardiaque. Tous ces tests seront suivis d'une mesure de la pression artérielle chez cet animal pour avoir tous les paramètres physiologiques en relation directe avec les maladies cardiovasculaires. Dans un second temps, nous profiterons de cette étude pour former le personnel de notre institut, déjà compétent chez la souris, à ces techniques chez le rat dans les meilleures conditions pour les animaux.

Afin de réduire au minimum le nombre de rats utilisées et d'un point de vue pratique lié à l'hébergement de ces animaux, nous utiliserons pour ce projet 3 groupes de 8 rats mâles et femelles de souches différentes habituellement utilisées dans le domaine cardiovasculaire (48 rats au total). Pour avoir un contrôle positif, nous utiliserons un groupe de rats transgéniques, 8 rats mâles et femelles (16 rats au total) présentant un problème cardiaque (hypertrophie ventriculaire et/ou une communication septale intraventriculaire) et ayant comme contrôle une des souches utilisées auparavant.

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

A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation des animaux de laboratoire par des techniques alternatives pour étudier les fonctions cardiaques au niveau anatomique et fonctionnelle

**9479** Nous étudions le rôle de la déficience du gène Fanconi anemia (FANC). La maladie de Fanconi (AF) est caractérisée par un ensemble de malformations congénitales variables, une insuffisance de la moelle osseuse d'apparition retardée et un risque élevé de leucémie aiguë et de cancers. Comme tout cancer, les leucémies se développent via l'accumulation de changements génétiques précis. Les leucémies myéloïdes aiguës sont une classe hétérogène des leucémies de l'âge adulte. Avec le vieillissement progressif de la population, leur fréquence est destinée à augmenter et elles seront sans doute un problème majeur de santé publique dans les années à venir. Comprendre leur origine et leurs caractéristiques moléculaires sera donc de grande utilité pour une meilleure prise en charge des patients. Nous avons aussi montré que l'absence de FancA affecte le développement précoce des lymphocytes B (LB) dans la moelle osseuse et perturbe la maturation de la réponse immunitaire humorale

Notre objectif est 1) de définir quels changements génétiques sont importants lors de l'initiation et de la progression des formes de leucémie myéloïde aiguë, lié à la perte de fanc; 2) de disséquer le rôle de la protéine FancA dans le développement des LB.



Objectif1 : Nous disposons d'une lignée de souris qui surexpriment le facteur de transcription Spi-1, qui contrôle la différenciation hématopoïétique. La surexpression de Spi-1 conduit au développement rapide d'une anémie et d'une splénomégalie (étape pré-leucémique). Nous avons observé que la combinaison, dans une même souris, de la perte du gène de la protéine FancA, qui participe au contrôle du bon déroulement du processus de réplication du matériel génétique, et de la surexpression du facteur de transcription Spi-1, conduit au développement d'une leucémie agressive. Notre objectif est d'utiliser ces souris génétiquement modifiées pour découvrir les altérations géniques somatiques subséquentes associées à la transformation tumorale, dans le contexte de ces souris développant une leucémie.

Pour ce projet il est indispensable d'utiliser des animaux car le projet porte sur l'identification des mécanismes de prédisposition au cancer et sur le suivi du processus de développement tumoral dans l'organisme entier. Les résultats préliminaires sur la base desquels ce projet a été établi sont encourageants et ont été obtenus in vitro par des expériences sur des cultures de cellules humaines et murines. Néanmoins, il faut utiliser maintenant un modèle in vivo car aucun autre modèle biologique n'apporte le même niveau d'information : les données in vitro que nous avons obtenues sont incomplètes car, dans le processus étudié, les facteurs environnementaux (cytokines, facteurs de croissance, autres cellules) exercent un rôle extrêmement important, et ceci ne peut être mesuré que dans un organisme vivant entier.

Au vu des premiers résultats encourageants, nous proposons de démontrer l'implication des deux protéines (FancA et Spi-1) dans le processus leucémique dans un modèle de souris génétiquement modifiée. Les expérimentations in vivo montrent clairement l'action tumorigène de ces deux facteurs, le processus étudié de tumorigenèse s'appliquant à des organismes vivants dans leur intégrité et leur complexité. Notre objectif est d'utiliser les souris génétiquement modifiées pour découvrir les altérations géniques associées à la transformation tumorale. Nous mettrons en œuvre deux procédures pour l'objectif 1.

Objectif 2 : Nous prévoyons d'étudier la lymphomagenèse des souris invalidées pour fancA. Ce processus faisant intervenir de nombreuses interactions cellulaires in vivo, son étude in vitro est limitée (on ne peut pas analyser toutes les lignées) et nécessite l'intervention de cytokines produites in vivo. Ce projet consiste à reconstituer les moelles en injectant des cellules souches déficientes pour fancA dans la moelle des souris irradiées sub-létalement. Les souris ne développent pas de tumeurs.

Le nombre total d'animaux prévu pour le projet sera de 1120 souris.

Afin de limiter la souffrance au minimum, les mesures de soins palliatifs ou d'arrêt seront mises en place dès que les points limites que nous avons définis seront atteints. Toutes les injections seront faites sous anesthésie, et les animaux génétiquement modifiés ou expérimentés seront examinés deux fois par jour.

Nous avons prévu un seul groupe contrôle commun aux deux groupes d'animaux étudiés (objectif 1), ceci est un point de réduction. Nous avons aussi envisagé d'optimiser les données obtenues sur chaque animal en analysant simultanément plusieurs organes du même animal, ce qui est un point de réduction et de raffinement (optimisation).

Dans l'objectif de respecter le raffinement, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés, et nous privilégierons toute étude in vitro sur modèles cellulaires établis, ou sur cellules primaires de patients, nous permettant de valider nos hypothèses de travail. L'ensemble du personnel impliqué dans ce projet est formé aux procédures expérimentales sur animaux.

**9480** Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont inopérables en raison de leur nature infiltrante et de leur localisation profonde dans le tronc cérébral. Elles sont chimiorésistantes et la radiothérapie (RT) n'est efficace que transitoirement. En cela, ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Actuellement, peu de modèles d'étude de cette maladie sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouvelles thérapeutiques reste encore très limitée.

Il a été récemment identifié, chez les patients, deux sous-groupes de DIPGs, chacun présentant une réponse à la radiothérapie différente. Nous souhaitons dans cette étude, modéliser ces différentes réponses à l'irradiation in vivo afin de mieux comprendre la résistance de certaines tumeurs à la radiothérapie. La réponse à la radiothérapie a été évaluée in vitro et des études mécanistiques sont en cours d'évaluation. Seulement le microenvironnement tumoral, uniquement accessible dans un être vivant complexe, joue un rôle important dans la radiorésistance des tumeurs, d'où l'importance de travailler sur des animaux vivants.

Le second objectif de cette étude est d'évaluer la combinaison entre la radiothérapie, traitement conventionnel du DIPG, avec un médicament, le mébendazole, dont l'efficacité pré-clinique in vivo n'a été que limitée en monothérapie.

Une singularité des gliomes du tronc cérébral résulte dans leur phénotype systématique d'infiltration des structures normales, l'absence de masse tumorale et l'importante capacité d'invasion du tronc cérébral dans un premier temps, puis plus largement du cerveau au décours de la maladie. Ces particularités résultent des interactions des cellules tumorales avec leur stroma qui ne peuvent être appréhendées que dans des modèles sur animaux vivants, où la variété et complexité du microenvironnement tumoral peut être reproduite. De plus, la barrière-hématoencéphalique est une limitation très importante dans le traitement de cette maladie (barrière non rompue) et il est nécessaire d'évaluer les traitements in vivo sur des modèles orthotopiques afin de pouvoir prétendre à une nouvelle médication pour les phases cliniques.

Nous avons récemment réussi à développer huit modèles de xénogreffes à partir de lignées de cellules souches cancéreuses établies à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG. Ces tumeurs, modifiées in vitro, sont bioluminescentes et peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude. L'évaluation du mébendazole en combinaison avec la radiothérapie in vivo ne sera réalisée que lorsque l'étude in vitro sera évaluée et montrera une diminution significative de la survie cellulaire. Nous conduirons ces études sur 3 modèles vivo radiorésistants ainsi que sur 3 modèles radiosensibles (définis dans la première étude).

Les évaluations de l'efficacité de la radiothérapie et de la combinaison mébendazole/radiothérapie seront déterminées à l'aide de tests statistiques adaptés, et 10 animaux/groupe seront suffisants pour valider l'analyse. Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux sont hébergés en groupe et le milieu est enrichi. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation de 560 souris.

**9481** Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont inopérables en raison de leur nature infiltrante et de leur localisation profonde dans le tronc cérébral. Elles sont chimiorésistantes et la radiothérapie n'est efficace que transitoirement. En cela, ces tumeurs sont universellement incurables et constituent un des plus grands défis thérapeutiques de l'oncologie pédiatrique à ce jour.

Actuellement, peu de modèles d'étude de cette maladie sont disponibles et l'exploration de l'activité de nouvelles thérapeutiques reste encore très limitée. Nous avons récemment réussi à développer huit modèles de xénogreffes à partir de lignées de cellules souches cancéreuses établies à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de DIPG. Ces tumeurs, modifiées in vitro, sont bioluminescentes et peuvent être suivies au cours du temps par imagerie limitant ainsi le nombre d'animaux employés dans l'étude.

Nous souhaitons dans cette étude, évaluer l'impact de l'inhibition du gène VRK3 sur la croissance tumorale. En effet, lors d'un crible utilisant des molécules synthétiques in vitro, l'inhibition du gène VRK3 a été identifiée comme induisant une diminution significative de la survie des cellules tumorales. Les résultats de ce crible ont été confirmés sur un plus grand nombre de lignées cellulaires in vitro. Il est nécessaire à présent d'évaluer l'effet de l'inhibition de VRK3 in vivo, seule possibilité de représenter un organisme entier (complexité tumorale, microenvironnement tumoral,

pharmacocinétique, toxicité, ...), avant de pouvoir soutenir l'identification de médicaments le ciblant et un passage vers la clinique humaine.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

En effet, l'utilisation d'animaux est incontournable. Une singularité des gliomes du tronc cérébral résulte dans leur phénotype systématique d'infiltration des structures normales, l'absence de masse tumorale et l'importante capacité d'invasion du tronc cérébral dans un premier temps, puis plus largement du cerveau au décours de la maladie. Ces particularités résultent des interactions des cellules tumorales avec leur stroma qui ne peuvent être appréhendées que dans des modèles d'animaux vivants, où la variété et complexité du microenvironnement tumoral peut être reproduite.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse et une analgésie sera pratiquée en post-opératoire et dès l'apparition d'au moins un signe clinique pour éviter toute souffrance. Les points limites seront strictement appliqués. Les animaux seront hébergés en groupe et le milieu sera enrichi. L'ensemble de ce projet comprend l'utilisation d'au maximum 800 souris.

**9482** 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. Le traitement des maladies ischémiques consiste principalement à administrer des médicaments qui inhibent l'agrégation des plaquettes et ainsi les thromboses. Cependant, des progrès restent à faire pour obtenir des traitements plus efficaces. Notre objectif est d'évaluer le bénéfice anti-thrombotique de nouvelles combinaisons de médicaments à activité antiplaquettaire.

La thrombose est un processus intégré qui fait intervenir de multiples acteurs cellulaires (cellules sanguines -plaquettes, leucocytes-, cellules endothéliales de la paroi vasculaires), les protéines plasmatiques et le flux sanguin. Les modèles *in vitro* ne sont pas assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par ces phénomènes intégrés. Ainsi, il est nécessaire de recourir à un modèle animal permettant de modéliser au plus proche les caractéristiques de la pathologie humaine et ainsi comprendre les mécanismes mis en jeu.

Nous étudierons l'impact de ces nouvelles associations médicamenteuses dans différents modèles de thrombose chez la souris. Ces modèles, qui diffèrent par les mécanismes leur mode d'induction et les mécanismes d'activation des plaquettes, permettent de couvrir les situations pathologiques différentes, rencontrées chez l'homme.

L'ensemble de cette étude nous permettra de déterminer si ces nouvelles associations médicamenteuses sont plus efficaces que celles existantes, de manière à améliorer la prise en charge de cette pathologie.

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 tissu sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les expériences de thrombose seront réalisées sur des animaux anesthésiés, qui seront ensuite euthanasiés avant leur réveil, en vue de prélever différents tissus.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études *in vitro* sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 1380 souris.

**9483** Le présent projet s'inscrit dans le prolongement d'une étude préliminaire précédemment réalisée dont l'objectif était d'évaluer l'intérêt de l'emploi d'un dérivé de l'activateur du plasminogène dans la prise en charge de la tendinite chez le cheval. En effet ces pathologies représentent aujourd'hui une des

causes les plus fréquentes d'arrêt de carrière et de baisse de performances chez les chevaux de sport et de courses. Outre les conséquences sur le bien être et la carrière sportive de ces athlètes, les tendinites génèrent des pertes économiques majeures pour la filière équine. Elles restent donc un véritable défi thérapeutique.

Nombre de ces lésions apparaissent par un processus de fatigue du biomatériau (tissu tendineux) en raison de sollicitations mécaniques élevées et répétées. Cette fatigue tendineuse chronique aboutit à une tendinite clinique aiguë avec rupture de fibres collagéniques, formation d'un hématome (saignements) et d'un œdème intra-tendineux.

Différents traitements sont en développement pour améliorer la cicatrisation de ces lésions comme les cellules souches, le PRP ou le RGTA. Toutefois aucune de ces thérapeutiques ne s'intéresse à la phase très précoce (aigüe) de la tendinite, c'est-à-dire à la gestion de l'hématome intra-tendineux. Le postulat était alors qu'en le réduisant, la vitesse et la qualité de la cicatrice de la lésion pourrait être améliorée ce qui représenterait une vraie valeur ajoutée dans la prise en charge de ces affections. Cette hypothèse avait motivé l'étude préliminaire.

Le produit alors utilisé était une seconde génération de l'Actilyse (anti-thrombotique reconnu), obtenu par génie génétique, nommé OptPA, ayant comme principal intérêt de diminuer les risques de saignement secondaires à l'injection. L'étude préliminaire menée sur 3 chevaux avec la molécule humaine a conduit à des résultats très encourageants, tant sur la tolérance locale du produit que son effet bénéfique. En effet sur les 3 chevaux étudiés, les examens échographiques et pour 2 d'entre eux les résultats histologiques ont montré une meilleure cicatrisation du tendon lésé lorsqu'il était traité par rapport au placebo. Cette saisine envisage la suite de ce projet avec une étude sur un plus large effectif de chevaux en employant une molécule spécifique de l'espèce équine (OptPA2-eq) avec deux objectifs :

- validation de l'innocuité du produit (étude tolérance);
- confirmation de l'effet bénéfique de son emploi dans la prise en charge de la tendinite chez le cheval (étude efficacité). Ceci permettra à terme si les résultats sont positifs de passer au stade d'essai clinique.

L'étude tolérance consistera en deux administrations sous-cutanées du produit, à 24 heures d'intervalle, sur 4 chevaux à une dose 5 fois supérieure à celle étudiée. Une surveillance des paramètres cliniques et biologiques sera effectuée pour valider l'absence d'effet indésirable.

L'étude de l'efficacité d'OptPA2-eq, sera réalisée sur 14 chevaux, pour lesquels une tendinite chirurgicalement induite, selon un modèle reconnu internationalement pour sa validité scientifique, sera réalisée sur le tendon fléchisseur superficiel du doigt des deux antérieurs de chaque cheval. Les chevaux recevront alors deux injections intra-lésionnelles à 24 heures d'intervalle, avec sur un membre le produit étudié, et sur l'autre le placebo. Un suivi des paramètres cliniques, échographiques et biomécaniques de la tendinite sera alors conduit pendant 3 mois. Au terme de ce suivi les animaux seront euthanasiés pour permettre une évaluation par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), histologique et biochimique des lésions induites.

Le principe de remplacement ne peut s'appliquer à notre projet car l'utilisation de l'animal et de l'espèce cible s'impose pour valider l'innocuité du produit sur l'animal auquel il est destiné. Par ailleurs du fait qu'aucune autre espèce animale ne permet de reproduire les contraintes biomécaniques appliquées à l'appareil tendineux du cheval il est nécessaire de l'utiliser pour pouvoir valider les résultats de l'efficacité du produit étudié. En effet l'utilisation d'une autre espèce conduirait à des résultats non transposables au cheval et donc nécessiterait de répéter des expériences sur ce dernier.

Le nombre de 14 chevaux a été défini comme le nombre minimum pour s'assurer de l'exploitation statistique des résultats obtenus et éviter la répétition ultérieure d'expériences. Par ailleurs pour réduire le nombre d'animaux les chevaux utilisés pour l'étude tolérance (procédure de classe légère) le seront aussi pour l'étude d'efficacité. De plus sur chaque cheval les deux antérieurs sont utilisés afin de limiter le nombre total d'individus.

Enfin concernant le raffinement, les chevaux sont au maximum hébergés en paddock (avec, abris, eau et foin à volonté) dans les conditions proches du milieu naturel. Lorsqu'ils sont en boxe (4 x 4 mètres) un contact visuel entre eux est assuré et une mise à disposition permanente de fourrage et d'eau est réalisée. Pour la réalisation des manipulations un souci permanent de limitation du stress

va être mené en prévoyant de limiter le déplacement des animaux (avec par exemple la réalisation de tous les examens cliniques et des examens échographiques de l'étude de tolérance à l'écurie), de les examiner systématiquement par lots de 2 à 3 et en ayant recours à une sédation pour les actes d'injection intra-lésionnelle. Par ailleurs chaque procédure autorise en cas de réaction locale, de douleur de l'animal, le recours à l'utilisation d'anti-inflammatoires et d'analgésiques appropriés. Enfin il a été fait le choix pour le suivi de la cicatrisation des tendinites d'employer des techniques non invasives et indolores (échographie, mesure des forces intra-tendineuses par l'apposition d'un capteur ultrasonore sur la peau) contrairement aux implants intra-tendineux classiquement utilisés.

**9484** L'immunothérapie a modifié de façon radicale la prise en charge de plusieurs types de cancers. Cependant il existe des limites à ces traitements. Les 2 principales étant un taux de réponse souvent inférieur à 25-30% en monothérapie et des complications auto-immunes dont la fréquence augmente significativement en cas de combinaison d'immunothérapies. L'administration locorégionale d'agents immunomodulateurs a déjà montré son intérêt par rapport à (ou en association avec) un traitement systémique aussi bien lors d'études pré-cliniques que d'essais cliniques précoces. Les avantages attendus sont la diminution des toxicités, une augmentation des taux de réponse avec une meilleure pénétration des anticorps au sein de la tumeur et de son microenvironnement permettant de surmonter des cas de résistance primaires ou secondaires, et finalement un avantage économique car la dose utilisée en administration locale étant en moyenne 10 fois inférieure à celle injectée par voie systémique.

Afin d'optimiser l'administration intratumorale, une libération prolongée de l'agent actif pourrait présenter comme intérêt la nécessité d'une seule injection au lieu de quatre actuellement nécessaires, et une exposition continue de la tumeur à l'immunothérapie. Pour arriver à cela, nous avons mis au point des émulsions stables de nanoparticule protégeant l'immunothérapie.

L'objectif de ce protocole expérimental est de comparer l'administration locale d'immunothérapie avec ou sans vecteur à une administration systémique.

Pour répondre à cette question, nous explorerons l'activité de notre immunothérapie avec et sans vectorisation. Ce projet nécessitera un nombre de 165 souris. Actuellement il n'existe pas de modèles *in vitro* pertinents et permettant de traduire la réponse à l'immunothérapie telle qu'elle existe chez les patients. Pour limiter le nombre d'animaux employés, nous validerons d'abord la réponse à l'immunothérapie de notre modèle selon les conditions standards d'administration (non vectorisé, par voie systémique) et si un effet est confirmé alors nous pourrions évaluer l'activité de la forme vectorisée en comparaison de la formulation standard par administrations loco-régionales. Tous les moyens seront mis en œuvre pour améliorer le bien être des animaux. Toutes les procédures seront réalisées avec les protocoles d'anesthésie et d'analgésie nécessaires, les animaux seront stabulés en groupe et le milieu sera enrichi.

**9485** Le Vison d'Europe (*Mustela lutreola*) est l'un des trois mammifères les plus menacés de France avec un statut « en danger critique d'extinction ».

La destruction, dégradation et fragmentation de ses habitats (zones humides), la concurrence avec le Vison d'Amérique et les collisions routières sont les principaux facteurs responsables du déclin de l'espèce. Un renforcement des actions est nécessaire afin d'éviter sa disparition.

Ce programme, engagé sur 5 ans, est mis en place sur le bassin de la Charente qui représente un secteur d'intervention stratégique et prioritaire pour la conservation du Vison d'Europe en France, car exempt de population établie de Vison d'Amérique. Le projet s'inscrit sur le périmètre de 8 sites Natura 2000, situés sur les départements de la Charente et de la Charente-Maritime.

L'objectif principal du projet est de sauver une espèce en voie d'extinction en France dans son principal noyau de population. Plus spécifiquement, le projet permettra de réduire les causes de mortalité du Vison d'Europe, accroître la disponibilité en habitats favorables, améliorer les connaissances sur l'espèce et intégrer sa conservation dans les politiques locales d'aménagement du territoire.

Pour répondre à ces objectifs, le programme prévoit des opérations d'amélioration des connaissances sur la répartition, la biologie et l'écologie du Vison d'Europe sur le bassin versant du fleuve Charente. En effet, le Vison d'Europe est une espèce nocturne et peu abondante et la pénurie

actuelle d'informations détaillées constitue un frein majeur pour localiser et engager des actions de conservation efficaces sur les derniers noyaux de population.

Sont ainsi prévues des campagnes de détection directe (captures) et indirecte (pièges à poils, pièges photos, tunnels à empreintes...) de l'espèce pour actualiser la cartographie de la présence du Vison d'Europe.

Au cours des campagnes de piégeage (entre septembre et mars), si une femelle est capturée, celle-ci sera équipée d'un émetteur (implant intra abdominal) pour être suivie par radiopistage pendant la période de reproduction et de mise bas. Si un mâle est capturé à proximité d'une femelle, il sera également équipé pour un suivi lors de cette phase de reproduction (rut, interactions avec les femelles.).

Les individus équipés seront suivis par radiopistage pendant la période de reproduction (en moyenne février à septembre). Des localisations quotidiennes des animaux permettront de caractériser les gîtes diurnes de repos, mais également les sites de reproduction des femelles, afin de mettre en place des mesures de protection spécifiques de ces derniers. Les suivis d'activité nocturne permettront de cartographier les milieux exploités lors des phases de chasse.

Afin de caractériser les sites de mise bas et d'élevage des jeunes, tous les paramètres environnementaux seront relevés, à la fois ceux concernant la composition floristique et la structure de végétation mais aussi le type de gîte utilisé ou les conditions régnant dans les environs immédiats. Un piège-photo sera implanté au niveau de chaque site de mise-bas et d'élevage des jeunes, de manière à dénombrer et caractériser la portée dès ses premières sorties. La survie des jeunes sera ainsi approchée en dénombrant si possible le nombre de jeunes émancipés. En complément, la périphérie de chaque gîte sera quotidiennement visitée pour recueillir des crottes et définir le régime alimentaire par approche génétique. La combinaison de tous ces paramètres permettra de mieux cerner la période et les exigences des femelles en reproduction.

Dans le cadre de ce projet, la règle des 3R a été prise en compte. Afin d'acquérir des informations sur cette étape cruciale de reproduction, la capture dans le milieu naturel, la pose d'émetteurs et le suivi de femelles en reproduction est une nécessité. Aucune alternative de remplacement n'existe pour acquérir ces connaissances.

Toutefois, des alternatives de réduction sont prises en compte. Ainsi, un nombre limité d'individus sera équipé d'un implant (25 individus maximum) et pour réaliser le suivi par radiopistage, le choix s'est porté sur les implants intra-abdominaux. En effet, ces derniers ont montré leur innocuité que ce soit en termes de blessures ou de perturbation comportementale, alors que les émetteurs externes comme les colliers ou les harnais ont montré que chez cette espèce, quel que soit le type de matériaux utilisés, taille et forme, le bloc émetteur externe pouvait provoquer des blessures et qu'il gênait les individus dans leur action de chasse.

Enfin, le concept de raffinement est bien pris en compte dans cette phase d'expérimentation animale. En effet, le stress et la douleur seront minimisés grâce à 1) un local d'intervention situé au plus près des captures pour limiter le transport de l'animal, 2) un maintien dans sa cage de capture jusqu'à l'anesthésie pour éviter des transferts inutiles, 3) une mise à disposition d'une soupe de sardines pour éviter toute déshydratation et perte d'énergie avant les manipulations, 4) une anesthésie réversible par antidote pratiquée dès le début et pour toute la durée des manipulations, 5) un réveil rapide grâce à l'antidote dans une cage élargie dans laquelle une boîte gîte sera installée, 6) la mise à disposition d'eau et de nourriture (soupe de sardines, poisson frais) dès le réveil achevé 7) une détention réduite au strict minimum (relâcher le plus souvent moins de 24 heures après la capture).

Lors de ces interventions, un prélèvement sanguin sera réalisé pour engager par la suite un dépistage sérologique des pathologies les plus impactantes pour les populations. Le prélèvement sera réalisé en fin d'intervention par ponction dans la veine jugulaire, avant l'injection de l'antidote de réversion d'anesthésie. Une injection d'anti-inflammatoire sera réalisée afin de limiter la douleur post-chirurgicale et une injection d'antibiotique longue durée pour limiter toute complication post-opératoire.

**9486** L'Arthrose du genou est un problème majeur de santé publique dû au vieillissement de la génération « baby-boom », et à l'augmentation de la prévalence de l'obésité qui touche une majorité de jeunes actifs. Des phénomènes de descellement des prothèses surviennent suite à des problèmes

mécaniques ou à des infections. Le coût d'une reprise est 2,5 plus élevé par rapport à une primo-intervention, en plus des complications supplémentaires et des résultats fonctionnels. Le développement d'un implant personnalisé et instrumentalisé afin de détecter précocement une éventuelle infection permettra de répondre aux changements démographiques des 20 prochaines années.

L'objectif du projet est de donner une réponse innovante au problème de la prothèse du genou en créant donc un implant sur mesure (personnalisé grâce à l'impression 3D), et en facilitant son implantation (outils de réalité augmentée) et son suivi dans le temps (capteurs intégrés, miniaturisés et implantables). Dans ce contexte, nous évaluerons la fonctionnalité d'un capteur de pH visant à apporter des indices d'un éventuel développement infectieux au niveau de la prothèse (en complément d'informations issues des autres capteurs).

Dans le respect du bien être des animaux, nous veillerons à appliquer à notre étude la règle des 3R. Nous ne mènerons notre étude sur les animaux qu'après l'aboutissement d'étude in vitro préalables démontrant sur des lignées cellulaires la biocompatibilité des matériaux composant le capteur. Les modèles accessibles ne nous permettant pas de poursuivre notre programme ex vivo, la biocompatibilité sera ensuite évaluée in vivo chez le rat après 1 et 6 mois d'implantation, et en parallèle, la fonctionnalité in vivo du capteur sera évaluée. Au total, un maximum de 4 capteurs seront évalués, correspondant à un nombre maximal de 84 animaux pour l'étude, permettant l'exploitation statistique optimale des résultats expérimentaux recueillis. Tout au long de notre projet, les animaux feront l'objet de toute notre attention afin d'assurer leur bien être et d'éviter toute souffrance : ils seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et recevront une anesthésie ou un traitement antalgique adaptés au cours des procédures expérimentales menées.

**9487** Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans la croissance tumorale et l'efficacité de traitements anti-cancéreux. En effet, ces résultats montrent que certaines bactéries de la flore intestinale permettent la réinduction d'une réponse immunitaire anti-tumorale qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Ainsi, ces bactéries réduisent la croissance tumorale et amplifient l'effet de chimiothérapie et immunothérapie connus pour activer le système immunitaire.

Notre objectif est d'analyser l'influence de bactéries de la flore intestinale sur l'activation du système immunitaire et sur l'efficacité anti-tumorale de chimiothérapies. Par ailleurs, nous voulons déterminer le mécanisme d'action de ces bactéries pour activer le système immunitaire anti-tumoral.

Pour cela, nous administrerons des bactéries spécifiques puis, après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec la chimiothérapie. Ces expérimentations vont nous permettre de déterminer les bactéries améliorant la réponse aux chimiothérapies, et ainsi d'envisager une supplémentation en bactéries comme traitement adjuvant (additionnel) aux traitements anti-cancéreux.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 225 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, les différentes souches bactériennes et les différents types de cellules tumorales utilisés. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, un anesthésiant local sera appliqué à chaque injection.

**9488** La transition entre douleur aiguë et chronique est un phénomène pathologique aux retombées majeures en clinique, mais au mécanisme encore inconnu. Des données récentes supportent le

potentiel analgésique de la mycolactone, une toxine produite par la bactérie *Mycobacterium ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli.

Cette étude testera les effets analgésiques de la mycolactone dans un modèle de douleur post-chirurgicale chez la souris. Son efficacité sera comparée à celle de 2 anesthésiques locaux utilisés en clinique que sont la lidocaïne et la bupivacaine.

Cette étude permettra ainsi d'établir si un traitement post-opératoire avec la mycolactone peut prévenir la transition de la douleur aiguë vers la douleur chronique. Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures.

- Remplacer : Nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes alternatives pour réaliser le projet. La modélisation de la douleur post-chirurgicale nécessite la présence d'un réseau nerveux complet (terminaisons nerveuses, nerfs, moelle épinière et cerveau). De plus, l'évaluation de l'effet analgésique des traitements nécessite l'animal vigile. En effet; les effets thérapeutiques des divers traitements sont évalués à l'aide de tests comportementaux impliquant une réponse motrice et intégrée de l'animal. Le modèle *in vivo* est nécessaire pour étudier l'intégration de la douleur.

- Réduire : Grâce à une connaissance du modèle associée à la puissance du test statistique utilisé, nous considérons que 8 animaux par groupe expérimentaux sont suffisant pour observer ou non un effet significatif. De plus, l'utilisation d'animaux consanguin limite la variabilité phénotypique.

- Raffiner : Les procédures invasives sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement enrichi (nid, matériel à ronger.). Les animaux ont la possibilité de se soustraire aux tests par une réponse réflexe de retrait de la patte mettant ainsi fin à la procédure.

Ce projet nécessitera un maximum de 211 souris.

**9489** L'obésité, actuellement considérée comme une épidémie, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. Cette pathologie, caractérisée par une surcharge pondérale, est également associée à une augmentation des lipides (cholestérol et triglycérides) dans le sang et dans le foie, mais aussi à des anomalies de la régulation de la glycémie menant au développement d'un diabète de type 2.

Une équipe vient de montrer le rôle d'une bactérie intestinale, *Akkermansia muciniphila* (AKK) dans l'obésité et le diabète de type 2. En effet, elle est présente en moins grande quantité chez les patients obèses et/ou diabétiques. De plus, sa supplémentation entraîne une amélioration de l'état de la barrière intestinale ainsi que des paramètres métaboliques tels qu'une diminution de l'accumulation de graisses et de l'inflammation dans le tissu adipeux et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. La fermentation de certains composés alimentaires (fibres et protéines) par la flore intestinale fournit des métabolites (acides gras à courtes chaînes, intermédiaires du cycle de Krebs) qui peuvent être utilisés par l'intestin pour produire du glucose. De façon intéressante, cette production de glucose par l'intestin (PIG) en induisant un signal nerveux, exerce des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique et le contrôle glycémique comparables à ceux d'AKK.

A ce jour, les mécanismes par lesquels AKK exerce ses effets métaboliques bénéfiques ne sont pas connus et ce projet permettra de tester l'implication de la PIG en étudiant les effets d'un réensemencement avec AKK chez des souris dépourvues de PIG.

Cette étude pourrait permettre de mieux définir les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques sur l'organisme d'une modulation du microbiote intestinal dans les contextes d'obésité et/ou de diabète.

Les souris dépourvues de PIG ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles. Toutes les souris seront élevées et hébergées par groupe de 3 par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé.

Afin d'observer plus facilement des effets bénéfiques sur l'organisme, nous nous placerons dans le contexte d'un régime délétère en nourrissant les souris avec un régime riche en gras (High Fat =HF) pendant 4 semaines. Cette durée est néanmoins insuffisante pour entraîner l'apparition d'un état pathologique (obésité ou diabète).

Cette étude implique une réponse intégrée de l'ensemble de l'organisme, ce qui justifie le recours à l'animal.

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



Par souci de raffinement les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (prostration...). Le suivi du bien être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance. Le nombre total d'animaux (48 souris), a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

**9490** Le diabète est une maladie importante chez l'Homme. Cette pathologie est amenée à se développer de plus en plus avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie humaine.

Le diabète est correctement traité actuellement et l'espérance de vie des patients augmente, mais des complications de cette pathologie peuvent apparaître et être nombreuses chez des patients présentant un diabète sur de longues périodes. Ces complications peuvent toucher la rétine (rétinopathies), les reins (néphropathies), les nerfs (neuropathies). Dans ce dernier cas, les nerfs de la sensibilité de la peau étant touchés, il peut apparaître des complications de cicatrisation de la peau suite à des blessures bénignes ou non ressenties par les patients. La cicatrisation du tissu cutané est d'autant plus longue que le niveau de diabète du patient est important. Des complications encore plus invalidantes peuvent ensuite apparaître (ulcères, nécroses pouvant nécessiter des amputations).

Il est donc important d'avoir un modèle prédictif de cicatrisation de plaie chronique dans un environnement de diabète développé chez l'animal.

Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle in vitro de cicatrisation cutanée en conditions de diabète pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles in vitro de migration cellulaire et sur explants de peau qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.
- Ces modèles in vitro ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux appliqués directement sur la peau en application externe (topique)
- L'efficacité ne pouvant être testée in vitro, des premières preuves d'efficacité in vivo doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme)

Ce projet s'effectuera chez le rat (*Rattus norvegicus*) diabétique et non diabétique et utilisera un total de 1440 rats.

Le nombre d'animaux sera de 8 maximum par groupe de traitement (groupe d'animaux devant recevoir la molécule à tester ou le traitement thérapeutique). Ce nombre est le minimum pour avoir une significativité acceptable avec une variation de 15%, une puissance de 70 %, et une différence à souligner de 20 % entre groupes témoins et tests.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation des animaux en tant que modèle animal de cicatrisation cutanée ne sera utilisé 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 en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 8 animaux par groupe. De plus, le projet inclut, une évaluation en imagerie non invasive (tomographie optique de cohérence). Grâce à cette technique d'imagerie non invasive, un même lot d'animaux peut être évalué à plusieurs reprises (suivi longitudinal) et évite l'utilisation de plusieurs lots d'animaux évalués en procédure terminale à différents temps. A terme, cette procédure permettra de réduire le nombre d'animaux.
- Raffinement : Une observation quotidienne des animaux sera mise en place afin d'évaluer le bien être des animaux. Afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux, des points limites sont établis (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites...), enrichissement du milieu dans les cages, socialisation des animaux.

**9491** Le cancer est un terme général désignant toute maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Le nombre de nouveaux cas estimés en 2015 est de 385 000 en France métropolitaine, tandis que sa mortalité est estimée à 149 500 décès. La carcinose péritonéale désigne l'apparition d'une ou plusieurs tumeurs au niveau du péritoine, une membrane recouvrant l'abdomen et les viscères. Les carcinoses péritonéales peuvent être causées par des cancers de l'appareil digestif (estomac, colon, rectum), des cancers de l'ovaire ou des cancers du sein. Plus de 6000 personnes sont victimes de carcinose péritonéale chaque année.

Dans ce contexte, il existe différents types de traitements qui peuvent être utilisés. La chimiothérapie est un traitement médicamenteux qui agit par voie générale, c'est-à-dire qu'elle agit sur les cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps. Ce mode d'administration présente deux inconvénients :

- toxicité associée ;
- élimination rapide des molécules.

Pour pallier ces 2 effets délétères une formulation galénique de type hydrogel thermosensible peut être utilisée. En effet, l'utilisation de celle-ci permettrait d'augmenter la durée d'action des chimiothérapies et de réduire les effets secondaires associés. Des formulations de chimiothérapies ont été développées depuis plusieurs années. Afin de déterminer leur intérêt, ce projet propose de comparer la distribution in vivo (pharmacocinétique) des chimiothérapies seules injectées par voie générale (intraveineuse) à celle des mêmes médicaments encapsulés dans des hydrogels administrés localement. Pour cela seul un système complexe tel l'animal peut permettre de répondre à cette question.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier la pharmacocinétique d'un principe actif (PA). Nous évaluerons la pharmacocinétique de différentes formulations chez la souris BALB/cJRj saine après injection par voie locale. Ces pharmacocinétiques seront comparées à des pharmacocinétiques de PA non formulés injectés par voie générale. Les souris recevront une administration unique de médicament formulé ou non, puis à différents temps des prélèvements de sang seront effectués. Vingt-quatre heures après l'administration, les souris seront euthanasiées, les organes seront prélevés pour effectuer une analyse histologique. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 360 souris, nombre justifié par la pharmacocinétique réalisée et par le nombre de formulations (15 au total).

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous avons en effet préalablement évalué par des études in vitro plusieurs formulations pour ne tester chez l'animal que les formulations finales, ce qui nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, son apparence et son comportement, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études pharmacocinétiques nous pourrions identifier des formulations de composés à visée anti-tumorale ou anti-vasculaire plus efficaces et moins toxiques que les PA non formulés ce qui pourrait permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant le cancer.

**9492** La pré-éclampsie est une pathologie de la reproduction humaine (prévalence 1-5%) se traduisant par une augmentation importante de la pression artérielle et une augmentation de la quantité de protéine dans les urines de la mère. Elle entraîne des anomalies placentaires et un impact morbide maternel et/ou fœtal important. Ce projet vise à élucider les fonctions d'un facteur protéique, identifié chez l'homme dans des cas de pré-éclampsie.

La souris est considérée comme un bon modèle de placentation humaine, et notamment pour l'étude de la pré-éclampsie.

Nous générerons par modification génétique des souris chez qui la production de ce facteur soluble sera induite dans le placenta par utilisation d'une molécule particulière (la Doxycycline). Nous suivrons alors le phénotype des souris en cours de gestation par mesure de la pression artérielle, et la collecte d'urine. Nous testerons différentes approches thérapeutiques (aspirine dans l'eau de boisson, injection d'alpha-1-microglobuline). En fin d'expérience, nous collecterons les tissus cibles

des animaux pour étude ultérieure. Des études de biologie moléculaire permettront d'évaluer la part du nouveau facteur dans l'apparition de la pré-éclampsie.

Au cours de ce travail, 400 femelles gestantes seront analysées, ce qui correspond environ à 2500 fœtus en fin de gestation (au cours d'un programme de 5 ans). En conformité avec la règle des 3R, l'effectif a été calculé au plus juste pour avoir des résultats statistiquement valides. Par ailleurs, de nombreux tissus seront collectés en fin de gestation afin d'extraire le maximum d'informations des animaux étudiés (Réduction). Les signes éventuels de souffrance seront observés quotidiennement permettant d'euthanasier les souris de façon anticipée si les points-limites définis sont atteints; les prises de sang se feront sous anesthésie à l'isoflurane. 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. Il se matérialisera par du papier absorbant et des petites maisons. En fin d'expérience, les souris seront euthanasiées sous anesthésie (Raffinement). Notre travail nécessite l'analyse de placentas issus de gestations présentant une pré-éclampsie. La pré-éclampsie est une pathologie complète impliquant des interactions moléculaires entre le placenta et l'ensemble du système vasculaire maternel, dont l'analyse ne peut actuellement être remplacée. De fait, les méthodes alternatives comme les modélisations mathématiques, la culture cellulaire où les systèmes in vitro, ne peuvent déterminer précisément le rôle de notre facteur protéique soluble.

**9493** Contrairement à ce qui était autrefois admis, des neurones sont produits par le cerveau des mammifères, même à l'âge adulte. En effet, des cellules souches neurales sont présentes en très grandes quantités dans plusieurs régions du cerveau. Cependant, le nombre de nouveaux neurones est très faible par rapport au nombre total de neurones du cerveau. Le cerveau adulte, qui se répare donc assez mal, possède paradoxalement un grand pouvoir de multiplication des neurones. Si l'on savait stimuler la transformation des cellules souches en neurones fonctionnels, il serait possible de réparer les neurones lésés lors du vieillissement ou encore détruits par un traumatisme. L'objectif principal de ce travail est de caractériser le phénomène de neurogenèse à différents âges de la vie. Dans ce but, nous tenterons de décrire ce phénomène à différents stades : jeune, âge moyen, âgé, mais également de caractériser les différences qui peuvent exister entre mâles et femelles à ces différents âges. La méthode utilisée pour mesurer la neurogenèse nécessite l'administration d'une molécule permettant de marquer l'ADN des cellules en division et ensuite, après euthanasie des animaux, de rechercher ces marques au niveau des neurones cérébraux pour mesurer la quantité de neurones qui se sont divisés récemment. Ces expériences ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives puisqu'elles sont par définition intégrative et nécessitent donc d'étudier ces phénomènes à partir d'organismes entiers. Tous les efforts sont mis en œuvre pour respecter la règle des « 3R » : remplacer, réduire, raffiner. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, ces expériences seront réalisées sur un nombre maximal de 30 animaux, 5 de chaque sexe pour chacune des 3 catégories d'âge. Le caractère très répétable de la méthode de comptage immunohistochimique, basée sur l'identification stéréotaxique de zones d'intérêt, permet d'augmenter la puissance statistique et de réduire le nombre d'animaux requis pour atteindre la significativité statistique. Nous avons ainsi déterminé qu'un effectif de 5 animaux par groupe d'âge et par sexe nous permettrait de détecter des effets significatifs avec une puissance de 94%, ce qui est très satisfaisant. Par ailleurs, et dans le souci du raffinement, un maximum d'attention est apporté à la maîtrise des techniques utilisées et de leurs conditions d'application afin de limiter au maximum le stress et la douleur chez les animaux expérimentés.

**9494** L'objectif de ce projet est d'étudier sur le plan hémodynamique, énergétique et fonctionnel, les contraintes myocardiques induites par une ExtraCorporeal Life Support (ECLS) périphérique au cours d'un choc cardiogénique post-infarctus et d'identifier les stratégies thérapeutiques pharmacologiques et/ou mécaniques les plus efficaces à y associer pour limiter les conséquences potentiellement délétères de telles contraintes. Pour se faire, un modèle ovin de choc cardiogénique post infarctus du myocarde par injection intra-coronaire d'éthanol pur sera mis au point. Notre projet se propose : 1) de caractériser le modèle de choc cardiogénique post infarctus sur le plan hémodynamique, structurel par IRM et énergétique, 2) de caractériser l'hémodynamique intracardiaque d'un myocarde

défaillant sous ECLS périphérique pour des débits d'assistance oscillant entre 25% et 100% du débit cardiaque théorique et 3) d'évaluer l'efficacité des principales mesures additives qu'elles soient pharmacologiques (perfusion de dobutamine, d'adrénaline, de milrinone ou de lévosimendan) et mécaniques (contre-pulsion intra-aortique, assistance monoaxiale gauche et recours à l'ECLS pulsée). Les résultats d'un tel projet constitueront des données objectives pour appréhender au mieux les conséquences potentiellement délétères des contraintes induites par une ECLS périphérique sur un myocarde défaillant ainsi assisté. L'hypothèse de ce travail est que l'ECLS permet de restaurer de façon efficace la perfusion des organes périphériques mais induit des contraintes myocardiques importantes pouvant aggraver le remodelage ventriculaire.

La procédure permettra de développer chez la brebis anesthésiée et ventilée mécaniquement un modèle de choc cardiogénique d'origine ischémique en induisant un infarctus aigu du myocarde antérieur étendu. Un monitoring hémodynamique sophistiqué est mis en place. Une fois ce choc induit, une assistance de courte durée de type ECLS sera mise en place pour restaurer une perfusion d'organes. Une analyse fine de l'interaction entre l'assistance périphérique et l'hémodynamique intracardiaque sera réalisée. L'effet de mesures pharmacologiques et/ou mécaniques additives sera aussi évalué. 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 88 moutons au total pour une période de 5 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable.

Les retombées scientifiques principales de ce protocole seront (i) la caractérisation hémodynamique, énergétique et métabolique d'un modèle choc cardiogénique post-infarctus ovin, (ii) la caractérisation hémodynamique et énergétique du cœur défaillant assisté par un ECLS périphérique sans et (iii) avec la mise en place de stratégies thérapeutiques correctrices pharmacologiques et/ou mécaniques.

L'utilisation de l'animal reste, à ce stade, indispensable. Le modèle utilisé (ovin) est à ce jour le modèle le plus pertinent pour l'homme (pour des raisons anatomiques et métaboliques).

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

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

**9495** Le cancer colorectal (CCR) se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents tout sexe confondu et la majorité de ces patients développeront des tumeurs à distance du site d'origine appelées métastases, en particulier au niveau du foie (métastases hépatiques) diminuant leur chance de survie. Le traitement de choix de ces métastases est la chirurgie, lorsqu'elle est possible. Dans les autres cas, une chimiothérapie peut être proposée. La vascularisation des métastases hépatiques est quasi exclusivement assurée par le système artériel hépatique alors que le foie est majoritairement vascularisé par le système veineux porte (à 70% versus 30% par le système artériel hépatique). Se sont donc logiquement développées des techniques de cathétérisation de l'artère hépatique, c'est-à-dire introduction d'un cathéter dans la lumière de l'artère, afin d'augmenter la concentration des agents thérapeutiques au niveau des métastases. Différentes études ont montré, qu'à dose injectée équivalente, les métastases d'origine colorectale recevaient l'équivalent de 4 fois la dose en intra-artériel par rapport à la voie générale ou systémique (intraveineuse). Des études cliniques récentes ont aussi montré un meilleur contrôle tumoral chez des patients traités par chimiothérapie intra-artérielle hépatique (CIAH) versus chimiothérapie systémique intraveineuse. La chimiothérapie utilisée est le plus souvent l'Oxaliplatine. Cependant le contrôle tumoral n'est pas parfait, et nous souhaitons tester un nouvel agent thérapeutique : une version radioactive de

l'Oxaliplatine : le <sup>195m</sup>Pt-oxaliplatine, qui combinera les effets cytotoxiques habituels aux effets radiatifs. Le Platinium-195m est un émetteur d'électrons Auger. Les isotopes émetteurs électrons Auger ont des effets thérapeutiques connus sur les cellules cancéreuses, ils sont d'ailleurs utilisés chez l'homme en clinique.

Nous souhaitons tester sur un modèle animal (rats) l'efficacité thérapeutique de <sup>195m</sup>Pt-oxaliplatine après injection en CIAH. Nous limiterons au maximum le nombre de rats utilisés pour mener à bien ce projet (Réduction du nombre d'animaux). Trois lots d'animaux seront cependant nécessaires, correspondant aux différentes étapes du projet : 1) acquisition du geste de CIAH chez ce modèle murin, 2) mise en place du modèle animal de métastases hépatiques d'origine colorectale 3) comparaison de l'efficacité thérapeutique de l'oxaliplatine versus <sup>195m</sup>Pt-oxaliplatine, injecté par CIAH sur le modèle de métastases hépatiques. Nous n'avons pas d'autre alternative pour tester notre hypothèse que le modèle animal. En effet, il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico créant les conditions de diffusion intra-artérielle hépatique des agents thérapeutiques (Remplacement par d'autres modèles, non animal, malheureusement impossible). Les expérimentations seront optimisées grâce à la méthodologie appliquée aux animaux afin de réduire, supprimer ou soulager leur douleur ou leur détresse, et ainsi d'améliorer leur bien être (Raffinement des conditions expérimentales). Afin de réduire la douleur, les animaux seront analgésiés en amont de la chirurgie et surveillés pendant la période post-opératoire par une personne ayant reçu la formation en chirurgie. Si des signes cliniques de douleurs sont visibles, l'animal sera euthanasié. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 50.

**9496** Notre projet de recherche porte sur de nombreux petits ARN non-codant (ARNnc) appartenant à la famille des snoARN C/D. Dans le cadre de cette demande, nous envisageons de créer un modèle murin « perte-de-fonction » (souris Knock-Out, KO) en utilisant des méthodologies innovantes telles que le système CRISPR/Cas9. Nous proposons d'éliminer une portion du génome de la souris qui héberge le snoARN C/D – SNORD123. Les données de séquençage sur cellule unique que nous avons déjà obtenues, suggèrent un rôle pour ce snoRNA dans le maintien ou la régulation d'un phénotype de vaisseaux sanguins très particuliers, les vaisseaux High Endothelial venules (HEV). Nos travaux de recherche fondamentale permettront de disséquer la fonction moléculaire et physiologique du SNORD123, mais aussi contribueront vraisemblablement à améliorer notre compréhension de la régulation des vaisseaux High Endothelial Venules. D'une manière générale, ce projet permettra de mettre en place les conditions expérimentales à l'invalidation des gènes via le système CRISPR/Cas9. En effet, de telles approches révolutionnent véritablement l'analyse fonctionnelle des gènes chez des organismes dont la génétique est laborieuse. Au cours de notre programme de recherche qui porte sur un total estimé de 480 souris, nous veillerons en permanence à réduire le nombre d'animaux étudiés en respectant l'esprit de la règle des 3Rs (Réduire, Raffiner, Remplacer). Nous prélèverons et archiverons un maximum de tissus à partir d'un même individu, et ce, en prévision de futures expériences. Une lignée non utilisée sera congelée. Le caractère ouvert et exploratoire de notre recherche ne permet pas d'anticiper les phénotypes des souris KO générées. Cependant, nous limiterons le nombre des animaux étudiés en fonction de la pénétrance des phénotypes et de leurs reproductibilités. Les animaux seront monitorés : poids, symptômes cliniques de stress tels que démangeaisons, perte de pelage et symptômes cliniques de souffrance (si présentés), toute observation d'une quelconque souffrance animale conduira à l'euthanasie gazeuse (CO<sub>2</sub>) des animaux. Si les questions scientifiques le permettent, nous privilégierons des modèles cellulaires in vitro tels que la culture primaire de cellules endothéliales embryonnaires.

**9497** La coccidiose est une maladie parasitaire qui touche les élevages de volailles dans le monde entier. Cette maladie est causée par plusieurs espèces de protozoaires du genre Eimeria qui s'installent dans le tube digestif et induisent des lésions plus ou moins importantes affectant la croissance et le bien-être de l'animal. Parmi ces espèces, Eimeria tenella est particulièrement pathogène du fait des lésions sanguinolentes qu'elle induit au niveau du caecum de l'animal, pouvant provoquer de fortes anémies voire la mort des animaux les plus infestés. Actuellement les traitements reposent essentiellement sur l'utilisation de différentes familles d'anticoccidiens qui tendent à être

progressivement retirés du marché (certains sont des antibiotiques). La vaccination repose quant à elle exclusivement sur l'administration de souches d'Eimeria atténuées, présentant un coût important ainsi qu'un risque potentiel d'induction de la maladie chez certains individus. Il est donc urgent de proposer des méthodes alternatives de contrôle de ces maladies parasitaires. Parmi les solutions possibles, l'utilisation de plantes bioactives est prometteuse. Des études ont d'ores et déjà montré l'efficacité de certains composés tels que le capsicum ou le curcuma pour réduire les effets de pathologies intestinales.

L'objectif de ce projet est de proposer une alternative aux anticoccidiens classiquement utilisés en élevage. Pour ce faire nous voulons évaluer l'effet de deux combinaisons de composés bioactifs (dont la composition est confidentielle) sur une infection à Eimeria chez des poulets de chair de race Ross PM3 en comparaison avec un anticoccidien classique.

Pour ce projet, les animaux sont répartis en 5 groupes homogènes (poids) : 1- non infesté non traité ; 2- infesté non traité ; 3- infesté traité avec un anticoccidien ; 4- infesté traité avec la combinaison 1 ; 5- infesté traité avec la combinaison 2. Chaque groupe sera composé de 6 cages de 8 animaux qui seront élevés jusqu'à 42 jours. Afin de palier la mortalité et les défauts de croissance entre l'éclosion et le début des procédures nous prévoyons 20% d'animaux supplémentaires. Ces animaux surnuméraires ne seront inclus dans le projet qu'en cas de mortalité avant le début des procédures. Dans le cas contraire et autant que faire se peut, ils seront redirigés vers d'autres projets. Ce qui conduit à l'utilisation d'au maximum de 290 animaux (5 groupes x 6cages x 8 animaux x 1.2).

Nous suivrons au cours du temps la prise alimentaire, la prise de poids, l'excrétion d'oocystes dans les fèces ainsi que les lésions intestinales. Pour ce dernier point, deux animaux par cage seront mis à mort et autopsiés à J18 puis J26. Tous les animaux seront mis à mort à J42

Ce protocole sera mené dans le respect de la règle des 3 R :

-Remplacer : l'effet d'une infection à Eimeria sur l'intégrité de l'intestin ne peut être étudié qu'in vivo. Nous n'avons pas de modèle alternatif pour réaliser ce protocole autre que sur les animaux cibles.

-Raffiner : Après inoculation de l'agent infectieux, une visite quotidienne est réalisée dans la salle expérimentale afin de surveiller l'éventuelle apparition des premiers symptômes liés à la maladie. Si des animaux présentent des symptômes importants accompagnés d'un refus d'alimentation, ils seront immédiatement retirés du protocole et euthanasiés. Les animaux auront à leur disposition des pièces métalliques suspendues dans les cages pour enrichir le milieu.

-Réduire : le design expérimental a été fait pour permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus tout en ne compromettant pas l'exploitation des résultats. Le nombre d'animaux par lot a été optimisé afin d'obtenir des résultats significatifs pour les différents paramètres étudiés. Ainsi pour le paramètre score de lésion pour lequel nous aurons 12 animaux à chaque temps la puissance statistique calculée à partir de données issues d'essais préliminaires est de 96% avec un seuil alpha de 0.05 pour un test de Kruskal et Wallis. Pour le paramètre poids corporel à J42, pour observer une variation d'environ 10% entre le groupe infecté non traité et le groupe infecté supplémenté, sur un effectif restant de 24 animaux par groupe, on obtient une puissance statistique de 86% avec un seuil de 0.05% pour un test de comparaison deux à deux type Mann et Whitney. Ceci ne prend pas en compte une potentielle réduction des effectifs liée à de la mortalité.

**9498** L'objectif de ce projet est de développer un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne chez la gerbille. Le développement de modèle expérimentaux chez l'animal est essentiel à l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les dégénérescences des cellules. En effet, il est difficile de suivre le cheminement de la dégénérescence chez l'homme car les symptômes apparaissent alors que la maladie est à un stade avancé, où l'architecture rétinienne est déjà désorganisée. Les modèles expérimentaux permettent de mieux comprendre les mécanismes dégénératifs et ainsi d'évaluer des molécules potentiellement protectrices. La gerbille est un animal appartenant à la classe des petits rongeurs qui se distingue des rats et des souris par des mœurs diurnes. La gerbille présente donc l'avantage d'avoir une rétine riche en cellules photoréceptrices à cônes (cellules responsable de la vision diurne) et une zone macula-like (la macula étant chez l'homme une zone riche en cellules à cônes, responsable de la vision diurne). Par conséquent, la gerbille apparaît comme un excellent modèle d'étude dégénérescence des cellules photoréceptrices. Sur la base de notre expérience et en conformité à la règle des 3R, le nombre d'animaux sera limité

à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs : des techniques non invasives (électrorétinographies) seront réalisées avant de faire les prélèvements des tissus oculaires pour les analyses biochimiques, immunohistochimiques de manière à obtenir le maximum de données sur un même animal et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'élevage où l'environnement est contrôlé. Les protocoles expérimentaux sont établis avec rigueur et les animaux sont surveillés sur toute la durée du protocole au quotidien. Le remplacement des expérimentations in-vivo par des modèles in-vitro ou in-silico n'est pas envisageable dans le cadre de ce projet.

Afin de mener à bien ce projet, nous utiliserons 230 gerbilles.

**9499** Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) -la survenue de pauses respiratoires pendant le sommeil et ses conséquences- est en passe de devenir un véritable problème de santé publique avec une prévalence pouvant atteindre jusqu'à plus de 20-25% de la population adulte. L'hypoxie intermittente (HI) qu'il engendre fait qu'il est fréquemment associé à une fatigue diurne, une perte de productivité au travail, une survenue plus fréquente d'accidents et des atteintes cardiovasculaires (infarctus, remodelage vasculaire, rigidification des artères...). De plus le SAOS voit sa prévalence augmenter avec l'âge (jusqu'à 30-50% des personnes âgées). Chez les sujets âgés les effets du SAOS et par conséquent de l'HI sont controversés, notamment en ce qui concerne leur impact au niveau cardiovasculaire et la mortalité associée. Nous souhaitons par conséquent étudier l'effet de l'HI sur la structure et la fonction vasculaires au cours du vieillissement chez la souris, au niveau de l'organisme entier, des artères, des cellules vasculaires, aussi bien que des mécanismes moléculaires mis en jeu. Ceci inclura l'étude de la structure-fonction de la matrice extracellulaire, en particulier des fibres élastiques vasculaires, qui semble impactées par le SAOS. Pour ce faire, un système permettant de stabuler les souris en hypoxie intermittente, déjà présent au laboratoire, sera utilisé.

D'autre part, des facteurs génétiques peuvent avoir un impact fort sur la survenue du SAOS et sur les conséquences cardiovasculaires délétères engendrées par celui-ci, en particulier chez les patients atteints du syndrome de Marfan. Ce syndrome est lié à un déficit génétique de la fibrilline-1, une protéine majeure des fibres élastiques qui procurent aux vaisseaux sanguins leur élasticité, et conduit notamment à des dilatations aortiques et des anévrismes. Les patients Marfan ont une prévalence élevée de SAOS et ceux-ci, Mafran+SAOS, présentent une aggravation nette de leurs atteintes cardiovasculaires. En plus de l'étude de l'impact du vieillissement chez l'animal "normal" (= non-génétiquement modifié), nous étudierons les conséquences de l'atteinte génétique des fibres élastiques sur la structure-fonction cardiovasculaire de souris soumises à l'HI, au cours du vieillissement. Nous utiliserons pour cela deux modèles de souris : les souris hétérozygotes pour la protéine principale des fibres élastiques, l'élastine (souris Eln+/-), et souris déficientes pour la fibrilline-1 (Fbn-1+/mgDelta). Comme chez les souris sauvages, nous étudierons sur les souris Eln+/- et Fbn-1+/mgDelta l'effet de l'HI sur la structure et la fonction vasculaires au court du vieillissement chez la souris, au niveau de l'organisme entier, des artères, des cellules vasculaires, aussi bien que des mécanismes moléculaires mis en jeu.

Les résultats obtenus sur ces trois modèles de souris permettront de vérifier et serviront à comprendre les mécanismes présents chez les patients SAOS, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Notre projet inclut la règle des 3R :

La réactivité vasculaire repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats : 10 animaux par groupe sont prévus mais toutes les procédures expérimentales seront réalisées sur tous les animaux, ce qui permet de ne pas devoir recourir à des groupes d'animaux séparés/additionnels pour réaliser des procédures différentes. Après la réalisation des procédures in vivo et l'euthanasie des animaux, nous allons collecter les organes et tissus de ces mêmes animaux pour les utiliser au cours des études ex vivo et in vitro post-mortem, rationalisant encore ainsi le nombre des animaux utilisés.

Les conditions de l'hébergement de longue durée des animaux en vieillissement, destinés à être utilisés à l'âge de 24 mois, seront particulièrement surveillées afin de limiter au maximum les risques de décès spontané liés à l'âge. Des mesures particulières d'organisation des cages et des animaux dans les cages seront prises.

Les souris seront suivies avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet de 4 ans concernera 276 souris.

**9500** La prise en charge de la douleur aiguë et chronique relève d'abord de traitements médicamenteux qui, bien qu'anciens, assurent une amélioration uniquement modérée des symptômes douloureux. On peut considérer qu'aucune des grandes familles d'antalgiques disponibles n'a un rapport bénéfice/risque optimal à cause d'une efficacité limitée et/ou d'effets indésirables importants. Ceci justifie la recherche d'analgésiques originaux avec de nouveaux modes d'action visant à répondre aux besoins non satisfaits des patients.

Parmi les protéines impliquées dans la perception et la transmission de la douleur, les canaux calciques voltage dépendants (CCVD), notamment l'isoforme 3.2 (Cav3.2), ont récemment émergés comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de la douleur.

Les objectifs du projet visent à déterminer (i) le rôle des CCVD dans la physiopathologie des douleurs inflammatoires aiguë et chronique de type arthrite dans des modèles mimant ces douleurs ; (ii) de valider pharmacologiquement le blocage de ces canaux comme stratégie thérapeutique efficace dans le traitement de la douleur inflammatoire. Cette étude sera réalisée chez des souris mâles âgés de 8 semaines. Le nombre total d'animaux utilisés sur une période de 3 ans est estimé à environ 440, ce dernier est justifié dans le dossier technique et répond à la fois à la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement) et aux contraintes statistiques prenant en compte la variabilité des paramètres étudiés. Les animaux seront surveillés quotidiennement, si un animal présente une trop forte douleur (mesurée expérimentalement), un comportement stéréotypé ou anormal ou une posture anormale ou une réduction de poids de 20%, celui-ci sera euthanasié par le personnel de l'unité de stabulation animale.

**9501** L'utilisation de bactéries lactiques est en plein essor depuis ces dernières années notamment par leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. L'administration par voie orale de bactéries lactiques a un effet local au niveau de l'intestin en augmentant l'immunité intestinale ou en protégeant des bactéries enteropathogènes par exemple, mais il a été montré que certaines de ces bactéries pouvaient également avoir des effets protecteurs extra-intestinaux notamment au niveau des muqueuses respiratoires. L'émergence de cet axe « bactéries lactiques/intestin/poumon » se base sur la capacité des bactéries à moduler le système immunitaire muqueux et ouvre ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les infections respiratoires. Néanmoins, les études publiées sur ce nouvel axe montrent que les bactéries lactiques utilisées jusqu'à ce jour sont capables de contrôler l'inflammation (diminution de cytokines pro-inflammatoires) mais pas d'induire un profil anti-inflammatoire. Il est donc important d'étudier de nouvelles souches de bactéries lactiques au potentiel anti-inflammatoire ou tolérogène afin de prévenir les dommages tissulaires liés à une inflammation excessive et ainsi limiter le risque de septicémie.

Parmi les infections respiratoires, l'espèce bactérienne *Klebsiella (K.) pneumoniae* est placée au premier plan des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales telles que les pneumonies. Dans 15 à 20% des cas, ces infections évoluent vers un choc septique suite à un emballement de la réponse inflammatoire qui devient néfaste favorisant le passage de *K. pneumoniae* dans le sang.

L'objectif expérimental de ce projet est d'évaluer in vivo l'effet anti-inflammatoire et protecteur d'une souche de *Lactobacillus (L. plantarum CIRM653)* sur la réponse inflammatoire induite par la bactérie *K. pneumoniae* dans un modèle de pneumonie chez la souris. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles C57BL/6 (âgées de 6 semaines) infectées avec *K. pneumoniae* par instillation intra-trachéale et *L. plantarum* par sonde gastrique. La modulation de la réponse inflammatoire (infiltrat immunitaire, cytokines inflammatoires), la charge bactérienne dans différents organes et la dissémination systémique des bactéries seront les principaux paramètres évalués. Les



expérimentations auront une durée maximale de 10 jours, et les animaux seront euthanasiés à l'issue de ces expérimentations.

Le recours à l'animal est indispensable pour ce projet : en effet, il n'existe pas de méthode alternative permettant d'évaluer les mécanismes immunomodulateurs de bactéries lactiques dans l'axe intestin/poumons simultanément dans un même organisme hôte.

Les expérimentations et la méthodologie seront optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subies par les animaux. Raffiner la méthode utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Quotidiennement, les animaux seront pesés et un score clinique sera établi. Les expérimentations seront organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible, et chaque expérience sera exploitée au maximum. Le nombre maximal estimé d'animaux est de 96 souris sur une période de 12 mois.

**9502** La diminution de la pression ambiante s'accompagne de l'élimination des gaz initialement dissous dans l'organisme (loi de Henry), via la circulation sanguine et leur élimination via l'échangeur pulmonaire. En cas libération trop rapide par les tissus, ces gaz forment des bulles dans la circulation sanguine à l'origine de l'accident de décompression (ADD). L'ADD représente le risque le plus grave chez les plongeurs subaquatiques professionnels et de loisir, mais concerne aussi l'ensemble des personnes exposées à des diminutions de la pression ambiante : patients et personnels des chambres hyperbares, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers ...

Les symptômes de l'ADD vont de la simple démangeaison passagère jusqu'à la paralysie définitive ou, à l'extrême, au décès. Dans le cas d'ADD avec lésion de la moelle épinière, qui constitue la majorité des accidents de plongée (40 à 45 %, soit 120 à 130 cas par an en France), 20 à 30% des plongeurs accidentés conservent des séquelles neurologiques de gravité variable dont 10 % de formes invalidantes avec perte de coordination des muscles de différentes parties du corps. Il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité du traitement de cette pathologie.

L'administration intraveineuse de solutions de perfluorocarbone (PFC) a montré son efficacité chez des modèles animaux (rongeurs et mini porcs). Ce transporteur d'oxygène est potentiellement efficace dans le traitement de nombreuses pathologies, depuis les intoxications au monoxyde de carbone, l'aéro-embolisme artériel et les conditions d'ischémie tissulaires, jusqu'à l'ADD. A ce jour cependant, aucune formulation à base de PFC n'est autorisée par les autorités sanitaires pour un usage humain en raison d'effets secondaires importants. Une des causes est l'utilisation de polymères synthétiques, qui stabilisent le PFC en solution aqueuse mais qui sont aussi à l'origine de réactions immunitaires indésirables rendant la formulation biologiquement incompatible. Les recherches s'orientent donc vers la mise au point de préparations non toxiques, pouvant être stockées suffisamment longtemps et administrées directement dans la circulation sanguine sans effets secondaires indésirables. Dans ce contexte, l'encapsulation du PFC dans des nanocapsules d'albumine (Albumin-derived perfluorodecalin-containing nanocapsules, A-PFD-N) offre des perspectives prometteuses. Ces préparations présentent une faible toxicité autorisant des applications thérapeutiques ; de plus, l'enveloppe d'albumine, soluble à la fois dans l'eau et les lipides, ne provoque pas de réaction immunitaire ; Enfin, ces capsules sont stables en solution et peuvent être administrées par voie intraveineuse.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité de A-PFD-N dans la prévention de l'accident de décompression chez un modèle murin d'ADD.

Dans ce but, 60 rats seront soumis à un protocole standard de plongée fictive en chambre hyperbare après administration intraveineuse d'A-PFD-N. L'efficacité du prétraitement à l'aide de A-PFD-N sera appréciée à travers les différences de l'incidence des ADD après la plongée fictive. L'étude des mécanismes par lesquels le A-PFD-N protège de l'ADD permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'ADD.

Conformément à la règle des 3R,

• Remplacement : les symptômes de l'ADD étant exclusivement comportementaux, le remplacement par des modèles in vitro est impossible.

•Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en limitant l'effectif de chaque groupe expérimental (traités, contrôle véhicule, contrôle pression) au minimum nécessaire pour permettre la détection d'une différence.

•Raffinement : la procédure légère (administration des A-PFD-N) est réalisée sous anesthésie gazeuse ; pour la procédure sévère (exposition hyperbare), des points limites ont été définis afin de limiter au minimum nécessaire la souffrance liée à l'accident de décompression infligée aux animaux

**9503** L'ischémie-reperfusion des membres inférieurs est un problème de santé publique, causant potentiellement des dommages irréversibles aux tissus voire à l'organisme entier, mettant en jeu le pronostic vital.

L'ischémie se caractérise par un manque d'oxygénation d'un tissu, secondaire à une interruption de la circulation sanguine au niveau d'une artère. La reperfusion, nécessaire pour sauver le membre s'accompagne cependant d'une majoration des atteintes musculaires (atteinte des mitochondries, centrales énergétiques de la cellule), attribuée surtout à la libération des radicaux libres.

Cette situation est très fréquente dans la pratique de la chirurgie vasculaire au cours de laquelle le clamp artériel induit une ischémie, suivie d'une reperfusion lors du déclampage.

La recherche de stratégies en vue de la protection des muscles et des organes, notamment permettant de réduire les dysfonctions mitochondriales post-ischémie-reperfusion, est un des défis à relever. Nous avons montré que le peptide natriurétique de type B protège le muscle squelettique contre les effets délétères de l'ischémie-reperfusion. Par ailleurs, il a été montré que le peptide natriurétique de type B augmente le taux intracellulaire du guanosine 3',5'- monophosphate cyclique. Notre objectif est de déterminer si l'augmentation du guanosine 3',5'- monophosphate cyclique associée à une inhibition des phosphodiesterases des nucléotides cycliques protège le muscle ischémié.

Le présent projet sera réalisé avec 60 souris.

La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration des procédures. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les altérations des tissus cibles lors de l'ischémie-reperfusion sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien être animal en les groupant pour éviter le stress d'être isolé, enrichissement du milieu dans la cage par ajout de coton et de morceaux de bois et soins quotidiens aux animaux. Pour finir, en termes de raffinement nous assurons une lutte adaptée contre la douleur à travers le masque délivrant de l'oxygène et qui sera associée à différentes concentrations d'isoflurane en fonction du stade chirurgical.

**9504** Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le développement et l'entretien des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin. En effet, dans de nombreuses pathologies, certaines populations de bactéries 'bénéfiques' pour l'hôte sont diminuées au détriment de bactéries 'agressives' aux propriétés pro-inflammatoires. Dans la maladie de Crohn, il a été observé une surexpression d'une protéine au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle des patients. Cette protéine agit tel un récepteur pour certaines bactéries adhérentes et invasives. Une fois attachées à la muqueuse iléale, ces bactéries peuvent traverser la muqueuse et déclencher et/ou entretenir une inflammation intestinale.

La recherche pré-clinique permet d'étudier les mécanismes d'interaction de ces bactéries adhérentes et invasives avec l'hôte, le microbiote intestinal et le système immunitaire. Les souris n'expriment pas la protéine réceptrice de ces bactéries. Précédemment, un modèle de souris transgénique exprimant le récepteur humain à ces bactéries a été développé. Le transgène était exprimé dans différents organes dont le côlon, mais malheureusement très peu au niveau de l'intestin grêle. L'expression colique ne reflète pas la surexpression localisée au niveau de l'intestin grêle chez les patients. Un nouveau modèle animal a donc été créé, en plaçant le transgène sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression du récepteur au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle.

Dans le cadre de ce projet de 3 ans, l'implantation des bactéries adhérentes et invasives au niveau de l'intestin grêle sera analysée dans ce nouveau modèle de souris. Cette recherche aboutira au

développement d'un nouveau modèle pré-clinique de colonisation par les bactéries adhérentes et invasives plus proche du contexte pathologique chez l'homme. Il permettra de déterminer le rôle exact de ces bactéries dans la pathologie et par la suite, de mettre en place des moyens de prévention de leur attachement ou d'élimination de ces bactéries du tube digestif.

Dans ce nouveau modèle, le transgène est porté par le chromosome X, les mâles hémizygotes ou les femelles homozygotes pour le transgène peuvent être utilisés pour les expérimentations. Nous travaillerons sur les mâles hémizygotes et leur fratrie ne possédant pas le transgène (sauvage), en reproduisant des femelles hétérozygotes avec des mâles sauvages C57BL6/N.

\*\*\*Des essais préliminaires (durée : 12 mois) permettront de définir les doses de bactéries à administrer aux souris. Des essais de colonisation aiguë et chronique seront réalisés :

Procédure 1 : Colonisation aiguë : administration orale unique de 107, 108 ou 109 bactéries par souris (+lot non-infecté). Le nombre de 8 animaux par lot a été défini en fonction des résultats obtenus sur le précédent modèle de souris colonisé avec cette souche de bactéries.

Procédure 2 : Colonisation chronique : administration orale répétée des bactéries (3 fois/semaine, pendant 4 semaines) à la dose de 106, 107 ou 108 (+lot non-infecté), 8 souris/lot.

Si la procédure 1 ne permet pas une implantation suffisante des bactéries dans les mâles hémizygotes, elle sera renouvelée sur de nouvelles souris qui auront eu une administration au préalable d'un cocktail d'antibiotiques pour favoriser l'implantation intestinale des bactéries. Si et seulement si la procédure 1 permet la colonisation de l'intestin par les bactéries, la procédure 2 sera réalisée. Les essais préliminaires nécessiteront au minimum 64 mâles hémizygotes et 64 mâles sauvages et au maximum 96 animaux de chaque génotype.

\*\*\*Si ces essais préliminaires sont concluants, la validation de ce modèle préclinique sera poursuivie par 2 études menées en parallèle. Le but étant de diminuer le nombre d'animaux en mutualisant les lots non-infectés et infectés par les bactéries adhérentes et invasives (durée : 24 mois) :

--Etude de la virulence des bactéries adhérentes et invasives par rapport à une souche bactérienne non pathogène (non-adhérente).

--Influence du facteur d'adhésion majeur des bactéries adhérentes et invasives dans leur capacité de colonisation de l'intestin des souris. En l'absence de ce facteur, les bactéries perdent leur capacité à adhérer à des cellules épithéliales intestinales.

Quatre lots de mâles hémizygotes et 4 lots de mâles sauvages (8 animaux par lot) seront réalisés : 1/non-infecté 2/infecté par les bactéries adhérentes et invasives 3/infecté par une souche bactérienne non pathogène 4/ infecté par les bactéries adhérentes et invasives dépourvues de leur facteur d'adhésion principal.

Les deux protocoles seront réalisés lors de cette étude : procédure 3, une colonisation aiguë et procédure 4, une colonisation chronique. La procédure 4 sera engagée si et seulement si la procédure 2 a atteint les objectifs lors des essais préliminaires.

Les expérimentations seront répétées 1 fois pour validation de l'effet et nécessiteront au minimum 64 mâles hémizygotes et 64 mâles sauvages et au maximum 128 animaux de chaque génotype.

-Le nombre d'animaux utilisé lors de ce projet a été réduit au minimum : si les objectifs attendus lors des essais préliminaires ne sont pas atteints, les procédures 3 et 4 ne sont pas engagées. Le nombre minimum d'animaux sur l'ensemble du projet est de 64 mâles hémizygotes et 64 mâles sauvages et le nombre maximal est de 224 mâles hémizygotes et 224 mâles sauvages.

-Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé sur les animaux à la fin du protocole. Le nombre d'animaux a été déterminé pour assurer des résultats statistiquement significatifs. Les animaux seront élevés dans des cages de 450 cm<sup>2</sup> (4 animaux par cages).

-Un enrichissement est proposé aux souris : lamelles de cartons compressées, maisonnette.

-Une inflammation intestinale légère à modérée est attendue en réponse à l'infection bactérienne des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour l'évaluation de la souffrance.

Si un animal remplit ces 3 critères (points limites) :

1/perte de poids > à 15%

2/immobilité, ou position recroquevillée, ou dos vouté, ou augmentation de la fréquence respiratoire/respiration pénible

3/signes cliniques d'inflammation intestinale (pelage et orifices souillés avec diarrhée et/ou présence de sang dans les fèces)

Il sera immédiatement sorti du protocole et euthanasié par dislocation cervicale.

**9505** Dans le cadre actuel de l'intensification des activités agricoles, la biodiversité est exposée à un véritable cocktail de contaminants. En zones viticoles, les petits vertébrés sont notamment confrontés à l'exposition chroniques de fongicides. Malgré leur utilisation massive, l'impact de ces molécules reste peu étudié. Dans ce projet, nous nous focaliserons sur deux des molécules les plus utilisées (le tebuconazole, un fongicide organique utilisé en viticulture conventionnel et le cuivre, un fongicide inorganique, utilisée notamment en viticulture biologique). L'objectif de ce projet sera d'évaluer l'impact de doses environnementales sur le développement de moineaux domestiques juvéniles maintenus en conditions captives contrôlées. Le projet consistera en trois groupes de 30 individus (un groupe témoin non exposé, un premier groupe expérimental exposé à du cuivre dans son eau de boisson et un deuxième groupe expérimental exposé à du tébuconazole dans son eau de boisson). La durée du traitement sera de 60 jours (jusqu'à la fin de la croissance). Plusieurs paramètres morphologiques (croissance et condition), physiologiques (perturbation hormonale) et comportementaux (personnalité) seront examinés pour évaluer l'impact de ces traitements sur les juvéniles de moineaux domestiques.

Cette expérimentation prend en compte la règle des 3R : le remplacement n'est pas envisageable car l'expérimentation cible une espèce largement distribuée géographiquement et donc soumise naturellement en milieux agricole à cette contamination. En ce sens, ce projet vise donc à mieux comprendre leur réponse à une contamination chronique de leur environnement. La réduction a été prise en compte en limitant le nombre d'animaux employés (90 individus). Enfin, le raffinement comprendra le maintien des animaux dans des conditions de captivité optimales, notamment dans des cages individuelles enrichies (perchoirs, épis de millet, miroirs). Pour limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse associées potentiellement à cette procédure, les prélèvements seront effectués par du personnel expérimenté ce qui permettra de limiter la durée d'intervention.

**9506** Ce projet s'inscrit dans le contexte général du développement de biopiles implantables capables de produire de l'énergie à partir du glucose et de l'oxygène présents dans le corps d'un mammifère. Ces biopiles, qui pourront bénéficier de carburants potentiellement inépuisables dans l'organisme, pourront alimenter toute sorte de dispositifs médicaux (stimulateur cérébral, pacemaker, prothèse auditive, etc...). Le verrou que nous nous proposons de lever au cours de cette étude concerne la mise au point de l'enrobage de la biopile. En effet, en plus d'être parfaitement biocompatible, le matériau qui sera retenu pour envelopper les électrodes de la biopile devra à la fois présenter des propriétés d'étanchéité pour empêcher la diffusion des constituants de la pile vers l'organisme receveur, et avoir une porosité suffisante pour assurer la diffusion des substrats (carburants) et des catabolites (déchets). De plus, ces propriétés de diffusion devront être stables dans le temps après l'implantation du dispositif dans l'organisme.

L'objectif de ce projet est de sélectionner des biomatériaux adaptés et de caractériser des prototypes de biopile après enrobage. Les implantations qui seront réalisées chez le rat concerneront des échantillons de biomatériaux (tests de biocompatibilité) ou des biopiles complètes avec leur enrobage (caractérisation de prototypes).

Cette expérimentation nous permettra notamment de tester la tolérance de l'organisme à l'égard des matériaux utilisés et d'évaluer sur un plan qualitatif et quantitatif le développement du phénomène de « biofouling » (colonisation de l'interface entre le milieu intérieur et le dispositif par un tissu fibreux) in-vivo, sur de longues périodes.

Aucun modèle in-vitro ou ex-vivo ne peut se substituer totalement à ce type d'expérimentation. Cependant, l'ensemble des manipulations sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacer : Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux inclus dans ce protocole, tous les biomatériaux qui seront testés dans cette étude auront préalablement fait l'objet de tests de cytotoxicité sur culture cellulaires (manipulations actuellement en cours).

Réduire : Le nombre d'animaux (54 rats Wistar) a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique pertinente.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie. L'ensemble des procédures mises en œuvre sera réalisé sous anesthésie générale et sera suivi de soins post-opératoires avec médication. Enfin, une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien être.

**9507** L'étude proposée vise à mieux comprendre les bases physiologiques et comportementales de la très forte variabilité interindividuelle observées dans les réponses des poissons aux contraintes environnementales et notamment aux changements climatiques. Cette diversité de réponses ne pouvant pas s'expliquer sur une base uniquement génétique, l'histoire environnementale des animaux et ses conséquences sur la physiologie et le comportement des individus doivent être pris en compte. Dans ce contexte, la présente étude vise à examiner la relation entre performances métabolique et cardiaque, puis de vérifier dans quelle mesure cette relation est influencée par l'histoire environnementale des animaux. Dans un troisième temps, la relation entre performance physiologique des individus (taux métabolique et capacité cardiaque) et leur personnalité (témérité/timidité) sera évaluée. Cette évaluation de personnalité consistera à mesurer la durée de la période d'inactivité qui fait suite à l'introduction des animaux dans un environnement nouveau. Suite à cette période d'inhibition de quelques minutes, leur vitesse de nage sera mesurée. Dans ce projet les termes de normoxie et d'hypoxie sont définis de la manière suivante :

normoxie : eau parfaitement aérée,

hypoxie : eau appauvrie en oxygène.

L'expérimentation proposée portera sur 96 juvéniles de bars (*Dicentrarchus labrax*). Elle consistera à acclimater ces animaux à trois conditions expérimentales : normoxie à 15°C (n=24), normoxie à 22°C (n=24) et hypoxie à 15°C (n=48). Des mesures de respirométrie permettront alors d'estimer l'influence de la température (15°C versus 22°C) et du niveau d'oxygénation (100% versus 50% de la saturation à l'air) sur le métabolisme énergétique des animaux. Afin de tester la stabilité dans le temps des valeurs individuelles obtenues, ces mesures seront répétées à 1 mois d'intervalle. Quinze jours plus tard, les animaux seront successivement introduits dans un environnement nouveau (arène expérimentale) et leur comportement exploratoire sera filmé durant 1h afin de caractériser chaque individu en terme de témérité/timidité. Quinze jours plus tard, les performances cardiaques des individus seront ensuite mesurées via l'enregistrement, de manière non invasive, de leur électrocardiogramme au cours d'un test standardisé consistant à augmenter, de manière progressive (3h), la température de l'eau de la valeur d'acclimatation à 27°C. A Noter que cette température est inférieure de 5°C à la température critique supérieure du bar qui est comprise entre 32 et 35°C. Elle ne présente donc aucun risque pour la survie des animaux.

Cette étude sera réalisée dans le respect de la règle des 3R :

- Le nombre d'animaux envisagé pour ce projet (n=96) est en conformité avec les exigences de Réduction. Il permet en effet de tenir compte des contraintes zootechniques et notamment de la densité minimale d'animaux requise pour satisfaire le comportement naturellement grégaire de l'espèce étudiée. Il permet aussi de s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques compte tenu de l'étendue de la variabilité interindividuelle des processus étudiés.

- Nous répondrons également aux exigences de raffinement : tout sera mis en œuvre pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux expérimentés. Nous manipulerons les animaux avec soin et veillerons à ce qu'ils soient anesthésiés pour toute procédure ne requérant pas l'étude sur animal vigile.

- Le remplacement du modèle animal (Remplacer) ne pourra pas être fait dans la mesure où les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

**9508** Le vieillissement est accompagné par des nombreux changements physiologiques, y compris le système immunitaire. L'immuno-senescence a été identifiée comme un facteur augmentant le risque de contracter des maladies infectieuses chez les individus âgés. Cependant, les mécanismes de défense vis-à-vis des pathogènes ne concernent pas que la capacité de limiter la prolifération de l'infection, mais également d'en limiter les dégâts. Ce processus est appelé tolérance et indique la capacité d'un individu à limiter les coûts induits par l'infection. L'objectif de ce projet est d'étudier comment l'âge affecte la tolérance à l'infection par l'agent de la malaria murine. Il n'est simplement

pas possible de réaliser cette expérience autrement que sur des individus in vivo. Pour ce faire, nous comparerons les effets de l'infection sur les paramètres sanguins de souris jeunes (2 mois) et âgées (14 mois). Cette expérience portera sur 70 souris C57BL/6 femelles réparties en 2 groupes expérimentaux (un groupe âgé de 2 mois, un groupe 14 mois). Nous avons suivi la règle de réduction du nombre d'animaux (un nombre plus petit d'animaux compromettrait fortement la validité statistique des résultats). Pour ce qui concerne le bien être des animaux, ils seront hébergés dans des cages dont l'environnement sera enrichi (5 animaux par cage). Les souris seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien être. Si des signes de mal être sont perçus (perte de poids, changement de comportement avec prostration dans la cage) les animaux seront immédiatement sortis de l'expérience.

**9509** Le syndrome de l'intestin irritable (SII) représente une pathologie fonctionnelle digestive fréquente. Les symptômes principaux sont représentés par la douleur viscérale et une altération de la motricité intestinale (diarrhée, constipation ou les deux conditions alternées). Sa physiopathologie est mal comprise mais sont évoquées, une hypersensibilité viscérale, une augmentation de la perméabilité intestinale, une micro-inflammation et des modifications du microbiote intestinal. De plus, chez les patients, le stress est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans la l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes. Il semblerait qu'aujourd'hui une des cibles thérapeutiques serait de rétablir l'équilibre la flore intestinale par des traitements d'appoints comme l'apport en prébiotiques, probiotiques... Cette stratégie contribuerait à traiter le SII et à améliorer la qualité de vie de ces patients. Pathologie pour laquelle aucune molécule médicamenteuse n'est disponible en Europe.

La réduction de ce déséquilibre pourrait être favorisée par une consommation d'oligosaccharides. En effet, les avantages potentiels des oligosaccharides pour la santé sont étudiés tout particulièrement pour leurs effets prébiotiques. En effet, les oligosaccharides, permettent d'augmenter la population positive en bifidobactérie dans la lumière digestive.

Le but de ce projet de recherche est d'étudier l'effet d'un régime riche en oligosaccharides sur deux modèles rongeurs (souris) de fragilisation de la barrière intestinale et d'altération de l'équilibre du microbiote i.e le stress chronique (Water avoidance stress) et l'antibiothérapie.

En effet, nous étudierons l'effet d'une consommation d'oligosaccharides dans un modèle de souris qui présente une barrière intestinale fragilisée. Ce modèle reproduit les modifications physiopathologiques observées chez les patients atteints de SII, en exposant les souris à un stress chronique.

Parmi les nombreux facteurs environnementaux susceptibles de modifier le microbiote, l'antibiothérapie apparaît comme un des plus puissant.

Ainsi, nous étudierons l'impact d'une consommation d'oligosaccharides sur des souris dont le microbiote a été modifié par un traitement antibiotique. Ce projet permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie du SII et de proposer un traitement d'appoint aux patients souffrant de cette maladie.

Le modèle animal de stress chronique reproduisant les principales caractéristiques du syndrome de l'intestin irritable est nécessaire pour une approche globale de cette pathologie. Le SII est une pathologie d'étiologie méconnue, et de physiopathologie complexe (ex. altération de l'axe cerveau intestin, augmentation de la perméabilité intestinale, altération de la flore intestinale etc..), par conséquent, il n'est pas possible de reproduire la pathologie sur un modèle cellulaire.

Le modèle murin est un modèle pertinent et validé pour l'étude de la fonction de la barrière intestinale. Pour ce projet d'une durée de 5 ans un total de 864 animaux sera nécessaire. Tout est mis en œuvre pour tenir compte des règles de réduction et raffinement. En effet, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe expérimental a été limité en tenant compte de la variabilité inter-individuelle qui nécessite d'avoir des effectifs suffisants pour atteindre une validité statistique tout en réduisant au maximum l'inconfort, ainsi que toute douleur ou anxiété susceptible d'être subie par les animaux. Les souris de cette étude sont des animaux sains provenant d'un élevage agréé. Elles seront hébergées dans des conditions normalisées optimales, et suivies quotidiennement pour leur apporter tous les soins nécessaires. Si malgré toutes les mesures prises de réduire la douleur au minimum pendant

les procédures expérimentales, une souffrance est constatée la procédure sera systématiquement arrêtée.

## 9510

Les neurocristopathies forment un groupe hétérogène de maladies liées à des anomalies de différenciation, migration, survie cellulaire des cellules provenant des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales sont issues du tube neural de l'embryon (les futurs cerveau et moelle épinière) et sont à l'origine de nombreux dérivés comme le système nerveux périphérique et les mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation de la peau). Les signes cliniques de ces neurocristopathies sont multiples : malformations de la face, retard mental, surdité, malformation des yeux, défauts de pigmentation. Les principales neurocristopathies sont les syndromes de CHARGE, de Treacher Collins, de Waardenburg et de DiGeorge.

Un travail antérieur sur un médiateur cytoplasmique a montré le rôle essentiel pour la formation de la tête des vertébrés. Son absence conduit à des malformations craniofaciales sévères et d'autres manifestations cliniques qui permettent de dresser un tableau très proche des neurocristopathies humaines. Ce médiateur est essentiel à la différenciation et la survie de ces cellules issues des crêtes neurales. De nombreuses publications tendent à montrer que, bien que ces maladies aient des origines génétiques diverses, leur sévérité est fortement modulable par une modification du niveau d'activité d'un gène suppresseur de tumeur majeur. Nous souhaitons tester l'hypothèse suivante : "les caractéristiques cliniques de notre modèle, très proches des neurocristopathies humaines, sont modulables par l'inactivation de ce gène suppresseur de tumeur". Nous renforcerons ainsi notre hypothèse sur le rôle des dysfonctionnements de notre médiateur dans le développement de ce type de pathologie. Nous étudierons aussi les interactions très peu connues entre notre médiateur et ce gène suppresseur de tumeur. Nous disposons déjà des souris dont l'inactivation du gène de notre médiateur est conditionnée au stade développement embryonnaire correspondant au début de la migration des cellules des crêtes neurales. Nous souhaiterions les croiser avec des souris ayant une des deux copies du gène suppresseur de tumeur inactivée. Nous aurons alors à notre disposition la lignée de souris qui nous permettra de commencer notre étude.

274 animaux aux phénotypes dommageables seront nécessaires.

Remplacement : Nous travaillons sur des syndromes liés à des défauts de développement embryonnaire. Ces pathologies génétiques rares au tableau clinique complexe n'ont pas de modèle in vitro. En parallèle d'études des mécanismes moléculaires in vitro sur une lignée de cellule de crêtes neurales, il est nécessaire d'étudier le devenir de ces cellules in vivo, dans leur microenvironnement. Pour étudier l'impact réel des modifications génétiques sur l'évolution de ces pathologies, nous devons faire naître des animaux.

Réduction : Les combinaisons de croisement sont planifiées pour optimiser l'obtention de souris aux génotypes d'intérêt.

Raffinement : Nous adapterons les croisements en fonction du nombre de femelles obtenues et des combinaisons de gènes. Nous arrêterons le maintien de la lignée dès que les résultats obtenus nous le permettront. La lignée sera cryopréservée afin de pouvoir la revitaliser si nécessaire. Tous les animaux d'intérêt seront utilisés à des fins scientifiques.

## 9511

Les prothèses vasculaires aujourd'hui utilisées par les chirurgiens ont de faibles performances pour remplacer des artères de petit diamètre au niveau du cœur et des jambes. Le chitosane est un matériau naturel biocompatible utilisé dans de nombreuses applications médicales et pharmaceutiques et plus récemment en ingénierie tissulaire. Dans un précédent projet, nous avons démontré la compatibilité avec les tissus, d'une préparation innovante de chitosane, par une série d'expérimentations in vitro et in vivo pour des applications vasculaires. Nous avons modulé les conditions physico-chimiques de préparation du chitosane pour produire des gels à propriétés mécaniques et biologiques satisfaisantes pour remplacer des artères.

Description du projet :

Les objectifs de ce travail seront de confirmer dans un modèle de mouton, à 3 et 6 mois, les résultats prometteurs obtenus sur 3 jours en vue d'utiliser le chitosane pour construire des greffes vasculaires (sutureabilité, résistance à la pression artérielle, perméabilité...) et de s'assurer que le chitosane utilisé

est bien toléré et s'intègre bien dans les tissus environnants. Si les résultats attendus sont confortés, cela confirmera la capacité de ces hydrogels de chitosane pour constituer des pontages d'artères dans des applications cliniques.

Justification et contexte lié aux 3R :

- Des études in vitro ainsi que l'analyse bibliographique ont été menées au préalable afin de sélectionner les formulations les plus intéressantes à tester in vivo pour réduire au maximum le nombre de tests.
- Les données manquantes de compatibilité avec le sang ne peuvent être menées que sur l'animal entier vivant : la soumission du biomatériau au flux sanguin permet d'évaluer les effets du biomatériau sur les mécanismes de coagulation.
- La pertinence clinique est obtenue avec des moutons dont le comportement des vaisseaux est proche de celui de l'homme.
- 6 animaux seront utilisés afin de réduire les difficultés d'interprétation liées à la variabilité interindividuelle (n=3 par groupe, 2 temps de suivi 3 et 6 mois).
- Chaque animal sera son propre témoin, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Tout le projet sera conduit dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. Un protocole précis de prémédication, d'analgésie, d'anesthésie et d'euthanasie est mis en place.
- Le bien être des animaux sera particulièrement pris en compte lors de leur prise en charge, toutes les mesures de raffinement seront mises en place au niveau de l'intervention : prémédication et anesthésie générale, suivi des constantes, analgésie et antalgie adaptées, personnels compétents et formés mais aussi au niveau du suivi chronique : conditions d'hébergement et mesures d'enrichissement adaptées (paille, pierre à sel, hébergement avec leur congénères, alimentation adaptée...) et suivi quotidien par du personnel compétent.

**9512** Le rôle central des plaquettes sanguines est d'arrêter les saignements suite à une lésion vasculaire, un processus physiologique que l'on appelle l'hémostase primaire. Un processus similaire peut survenir dans un vaisseau malade et entraîner la formation d'un thrombus qui peut être responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, qui représentent la première cause de mortalité dans le monde.

L'observation de la formation des plaquettes sanguines dans l'organisme ou encore leur rôle dans certaines pathologies (lors d'une thrombose par exemple) sont des événements importants et encore mal connus. L'observation de ces phénomènes in situ directement sur l'animal permettrait de comprendre l'importance des acteurs environnants.

De nouvelles technologies comme la microscopie bi-photonique permet d'observer des interactions cellulaires en profondeur chez l'animal vivant anesthésié. Ces observations sont complémentaires des études in vitro réalisées en amont et permettent d'apporter des éléments supplémentaires à nos connaissances.

Ce projet porte sur l'utilisation d'animaux lors de la phase de test d'un futur achat d'un microscope bi-photon. Après avoir évalué les candidatures des fournisseurs potentiels, les trois meilleures candidatures seront invitées à réaliser une démonstration de leur équipement. Pour les départager, des expériences correspondant aux besoins du laboratoire et maîtrisées par du personnel qualifié seront réalisées pour évaluer les appareils.

Remplacer : L'acquisition d'un équipement de microscopie bi-photonique va nous permettre d'observer des interactions ou phénomènes dynamiques à l'échelle cellulaire dans un animal vivant anesthésié. Ces observations apporteront des informations que ne peuvent pas donner les échantillons fixés.

Réduire : L'utilisation d'animaux pour le choix définitif du microscope est une étape indispensable permettant à terme, de réduire le nombre d'animaux utilisés puisqu'il sera adapté au plus près du besoin de nos travaux de recherche. Nous avons sélectionné, sur dossier technique, les 3 microscopes pouvant répondre aux questions posées par nos travaux de recherche. Cependant, une phase de test est nécessaire pour utiliser dans des conditions réelles les candidats ayant répondu à notre demande.

Lors de ces phases de test, nous utiliserons essentiellement des animaux nés dans notre animalerie qui ne peuvent pas être utilisés dans d'autres projets, pour des raisons de génotype non souhaité par



exemple. Seule une expérience nécessitant un marquage fluorescent de cellules progénitrices des plaquettes utilisera des souris avec un génotype souhaité.

Raffiner : Afin de tester les équipements de différents fournisseurs, les techniques utilisées sont des expériences pratiquées et maîtrisées au laboratoire depuis de nombreuses années. Toutes les expériences seront réalisées avec des animaux anesthésiés qui seront euthanasiés avant leur réveil. Un total de 18 souris maximum sera nécessaire à la réalisation de ce projet.

**9513** Le cancer du poumon est la cause principale de décès par cancer dans les pays développés. Le décès par cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) est invariablement dû à la progression métastatique. Les cellules tumorales circulantes (CTC) sont des sous-populations très rares retrouvées dans le sang de patients et elles sont considérées comme le vecteur de la métastase. Il est indispensable de comprendre les bases du potentiel métastatique de ces cellules pour pouvoir les cibler avec de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce projet, nous utiliserons des lignées cellulaires établies à partir de CTC de cancer du poumon, qui sont très proches aux niveaux génétique et phénotypique des CTC de patients.

Nos cellules CTC exprimant GFP et luciférase (exprimant à la fois marqueur fluorescent et bioluminescent) seront administrées chez les souris immunodéprimées par la voie intraveineuse pour mimer l'environnement naturel de CTC (circulation sanguine). Ensuite les souris sous anesthésie générale seront analysées régulièrement par le système d'imagerie 3D dans le but de détecter d'éventuelles tumeurs/métastases. L'objectif du projet est de mettre en évidence le potentiel métastatique de CTCs (aucune publication à ce jour sur ce sujet), que nous avons bien caractérisées aux niveaux génétique et moléculaire. Les trois lignées présentent différentes caractéristiques moléculaires, pouvant influencer les capacités métastatiques de ces lignées cellulaires. La procédure permettra de suivre le même animal à différents temps du développement tumoral sans l'euthanasier. La procédure décrite dans ce projet a un caractère de stricte nécessité pour la détection de métastases pendant l'évolution tumorale et ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Aucune méthode alternative in vitro n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique d'évolution métastatique.

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

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

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

**9514** Le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, telles que le métabolisme ou l'immunité. Des études récentes montrent que la composition et la diversité du microbiote intestinal changent avec l'âge. Etant donné l'effet du microbiote sur la physiologie de l'hôte, il est possible que les changements de composition de la flore intestinale puissent directement affecter le processus de vieillissement. Dans ce projet nous souhaitons étudier le rôle du microbiote intestinal dans le vieillissement de l'hôte. Nous utiliserons pour cette expérience des souris C57BL/6 femelles de deux âges différents : 2 et 14 mois. L'expérience consiste dans le transfert du microbiote intestinal entre souris jeunes et âgées (et vice-

versa). Après transfert, la longévité des souris sera suivie. Nous envisageons d'utiliser un total de 160 souris sur une période de trois ans. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés. Il n'est malheureusement pas possible de remplacer le modèle in vivo car nous nous intéressons à l'effet du microbiote sur la longévité et le processus de vieillissement de l'organisme. Les souris seront hébergées en groupe (5 par cage), avec un enrichissement de l'environnement. Les souris âgées seront régulièrement surveillées, leur état de santé évalué en utilisant des grilles quantitatives portant sur l'apparence et le comportement. Un système de score allant de 0 à 3 sera mis en place pour chacun de ces critères (apparence normale = 0, manque de toilettage = 1, pelage terne = 2, piloérection et dos vouté = 3) (comportement normal = 0, légères modifications = 1, mobile et attentif, isolé = 2, agité ou immobile, prostration = 3). Lorsqu'on attribue un score de 3 pour les deux critères de façon répétée, l'individu sera euthanasié par dislocation cervicale. De la même façon si on constate une perte de poids rapide (20%) ou des masses tumorales dont le volume est supérieur à 2 cm<sup>3</sup>, l'individu sera euthanasié.

**9515** Les tissus adipeux (TA), longtemps perçus comme de simples réservoirs d'énergie, sont aujourd'hui décrits comme des tissus complexes et hétérogènes dotés d'une extraordinaire plasticité. En effet, leur masse, leur nature et leur biologie peuvent considérablement changer en fonction du contexte métabolique de l'individu ou de différents stress environnementaux. Ainsi, les TA sont aujourd'hui très étudiés non seulement pour leurs rôles dans le développement de l'obésité et des maladies métaboliques associées mais aussi pour leur implication dans les processus de régénération.

On distingue classiquement deux types de TA, les TA blancs spécialisés dans le stockage et la libération de l'énergie et le TA brun, spécialisé dans la production de chaleur et dans la dissipation de l'énergie. Le TA blanc est capable de se convertir en TA de type brun (on parle de TA beige) lors d'une exposition au froid par exemple.

Notre projet consiste à étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la plasticité des TA afin de mieux comprendre leur rôle dans les maladies métaboliques mais aussi dans les processus de régénération. Aucun modèle de remplacement n'existe puisque la plasticité des TA est révélée lors de l'exposition de l'organisme à des signaux physiologiques perçus par les systèmes nerveux et hormonaux. Par ailleurs, différents dépôts adipeux existent avec des spécificités qui leur sont propres (origines développementales, propriétés intrinsèques des cellules) et il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles cellulaires satisfaisants représentant chacun des différents types de TA. Le recours à l'animal est donc indispensable pour ce projet de recherche étant donné qu'aucune approche n'est capable de mimer correctement la réponse de l'organisme entier aux modifications de l'environnement.

Afin de faire une étude approfondie sur la plasticité des TA, nous utiliserons différentes souches de souris que nous soumettrons à différents contextes environnementaux (exposition au froid, régime riche en graisse) ou chez lesquelles une ablation partielle du TA sera réalisée.

Pour réaliser ce projet, nous envisageons de travailler sur des souris normales, des souris dépourvues d'adipocytes bruns et beiges fonctionnels et des souris dont différentes cellules du système immunitaire sont affectées. Nous travaillerons aussi avec des modèles de souris présentant des défauts de l'activité métabolique cellulaire.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, nous avons évalué à 2697 le nombre de souris nécessaires.

L'ensemble des fondements de la règle des 3R est appliqué dans ce projet :

- Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un travail de raffinement continu dans le but d'aboutir à des procédures de travail définies avec une procédure de suivi du bien être animal adaptées aux expériences. En effet, les animaux ne seront jamais seuls en cage et nous proposons aussi d'enrichir l'environnement des souris, favorisant le bien être de l'animal.

- Chaque étude est discutée avec l'ensemble de l'équipe de recherche afin de garantir la pertinence de chaque expérience et d'établir un protocole d'étude adapté à l'obtention de résultats fiables permettant d'atteindre l'objectif. La planification des expériences est organisée de manière à optimiser au maximum les études afin de réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des

groupes contrôles indispensable à la validation des résultats mais aussi en multipliant les tests faits à partir des tissus prélevés chez les animaux.

La surveillance des souris sera réalisée tous les jours, ceci permettant d'euthanasier les animaux en cas de comportements anormaux ou de souffrance. Les points limites sont perte de poids rapide (20% en quelques jours), prostration, poil hirsute, dos rond, accroissement rapide d'une ou plusieurs masses ou tout autre signe clinique, jugé par le technicien expérimenté, comme indiquant un état moribond.

**9516** La plasticité structurale est définie comme la capacité des cellules du cerveau à modifier leur morphologie et les circuits qu'elles établissent en réponse à un stimulus. Cette propriété du cerveau est relativement bien caractérisée pendant le développement embryonnaire, mais très peu étudiée dans le cerveau adulte où elle était même considérée comme inexistante il y a encore quelques dizaines d'années. Cependant, de plus en plus d'études chez l'Homme montrent que la forme même du cerveau est différente chez les patients souffrant de maladies neuropsychiatriques (schizophrénie, addiction...). La plasticité structurale du système nerveux central pourrait ainsi représenter un mécanisme important à l'origine de nombreuses maladies neurologiques chroniques. Certaines substances chimiques comme le principe actif du cannabis peuvent agir directement sur la forme des neurones et réduire rapidement la taille de leurs prolongements. Cet effet "anti-pousse" est provoqué par l'activation d'une protéine particulière, la myosine non-musculaire de type II, véritable moteur moléculaire au sein des cellules permettant la contraction de leur cytosquelette à l'instar des muscles. Cette contractilité neuronale rendue possible par la myosine pourrait ainsi être impliquée dans la genèse des troubles neurologiques (de type Schizophrénie) et pourrait donc représenter une cible thérapeutique d'intérêt pour leur traitement. Ainsi, le but de ce projet est d'étudier le rôle de cette myosine non-musculaire sur la plasticité neuronale des rongeurs (rats et souris). Pour cela, nous utiliserons des techniques d'imagerie par ultrasons permettant d'établir, en temps réel, une cartographie des structures du cortex cérébral chez les animaux traités, ou non, par des agents pharmacologiques susceptibles de moduler les effets de cette myosine. Des données récentes observées *in vitro* suggèrent en effet que les cellules du cerveau peuvent subir des variations morphologiques grâce au remodelage de cette molécule. Le recours à l'utilisation d'animaux de laboratoire est maintenant nécessaire pour ce projet. Les petits rongeurs représentent un modèle pré-clinique de choix pour l'évaluation pharmacologiques de composés actifs.

Pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur, souffrance, angoisse ou stress sera soulagé avec des analgésiques. Un grand soin sera porté afin d'empêcher tout stress ou souffrance des animaux en privilégiant des procédures non-invasives et en effectuant un suivi journalier du bien être des rongeurs grâce à une échelle dédiée. Le nombre d'animaux sera le plus faible possible tout en permettant de réaliser une analyse statistique des résultats. Ce projet nécessitera au maximum 152 animaux : 80 rats et 72 souris, pour une durée de 5 ans. Des analyses intermédiaires réalisées avant la fin du projet permettront de raffiner ce nombre et de le réduire en cas d'effet significatif à mi-projet. A terme, les résultats issus de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de la contractilité de la myosine non musculaire au niveau du système nerveux central. Ils pourraient permettre l'émergence d'une nouvelle classe pharmacologique pour la prévention ou le traitement de nombreuses maladies neuropsychiatriques.

**9517** La maladie d'Alzheimer (MA) représente un enjeu majeur pour notre société. La MA est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des fonctions cognitives. La MA est corrélée à des changements histologiques incluant des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et la mort neuronale qui conduisent inévitablement à la perte de mémoire et aux déficits dans la transmission synaptique. Dans la plupart des cas, la maladie d'Alzheimer n'est pas héréditaire, mais sporadique. La maladie d'Alzheimer sporadique est due à un ensemble complexe d'éléments touchant à la génétique, à notre environnement et à notre style de vie. Le vieillissement est le plus grand facteur de risque de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer.

Cette affection neuro-dégénérative se caractérise par la présence de deux types de lésions : les plaques séniles (formées de protéines  $\beta$ -amyloïde) et la dégénérescence neurofibrillaire (formée de protéines Tau) qui vont engendrer un stress oxydatif qui conduira à la mort neuronale.

La protéine Tau a un rôle prépondérant dans la stabilisation de l'architecture des cellules neuronales par son association avec les microtubules. Dans la maladie d'Alzheimer, cette protéine se retrouve hyperphosphorylée, ce qui aboutit à son agrégation et empêche l'association avec les microtubules conduisant par conséquent au stress oxydatif.

Récemment, un nouveau partenaire de Tau a été identifié : la protéine RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factors). Cette protéine joue un rôle essentiel dans la viabilité et la survie des cônes de la rétine, notamment en limitant la phosphorylation de Tau responsable du stress oxydatif et de la dégénérescence des cônes. Un déficit chez la souris de cette protéine aboutit à une hyperphosphorylation de Tau pouvant être reversée par une ré-expression de cette dernière.

Deux gènes, nucleoredoxin-like 1 et 2 (Nxn1-1 / Nxn1-2), codent pour les facteurs de survie des cônes RdCVF1 et RdCVF2 respectivement. Tous deux sont capables de réguler la protéine Tau et sont principalement localisées dans la rétine. De façon intéressante, le second facteur trophique RdCVF2 est également exprimé dans le système nerveux olfactif et central.

Dans un souci d'améliorer la compréhension des dégénérescences liées à la protéine Tau et de trouver de nouveaux régulateurs de celle-ci, le présent projet visera à évaluer les conséquences de la délétion du gène codant pour RdCVF2 ainsi que sa ré-expression chez la souris. En prenant en considération que ce facteur de survie est capable de réguler l'état de phosphorylation de Tau, crucial dans la survie cellulaire, nous évaluerons les fonctions mnésiques et d'anxiété par des études comportementales mais également la communication neuronale, la plasticité synaptique et la mort neuronale sur coupes cérébrales par analyses électrophysiologiques.

Nous utiliserons pour ce projet 60 souris à l'âge adulte. Ce projet se justifie pleinement d'un point de vue scientifique et sera réalisé dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) : -remplacement : l'étude du système nerveux, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal, certes simplifié, peuvent améliorer la connaissance du cerveau humain et son développement, et ainsi aboutir au traitement de ses pathologies et au développement de nouvelles thérapies. Nos expérimentations seront réalisées chez la souris. Ces rongeurs, de petite taille et d'élevage facile, possèdent un système nerveux dont le développement est extrêmement proche de celui du système nerveux humain, et dont l'organisation, certes simplifiée, est suffisamment complexe.

-réduction : le nombre de souris a été réduit autant que possible, tout en étant suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire a été effectuée par l'utilisation du programme GPower 3.1. Les résultats seront analysés avec le logiciel GraphPad Prism. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non. En cas de distribution normale, nous utiliserons des tests paramétriques (t-test pour comparer 2 échantillons, ANOVA pour comparer n échantillons). En cas de distribution non normale, nous utiliserons des tests non paramétriques (test de Mann-Whitney ou de Kruskal Wallis). Le nombre d'animaux sera éventuellement réduit si un effet statistique est observé avec un nombre plus faible d'animaux.

-raffinement : les animaux seront hébergés dans des cages avec portoirs ventilés. Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Leur environnement sera enrichi avec des bâtonnets à ronger. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'une semaine. Au cours de cette période d'acclimatation, les animaux seront manipulés, afin de les habituer à l'expérimentateur. Le bien être des animaux sera attentivement suivi quotidiennement par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de détecter toute souffrance, angoisse ou signes de stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés. En cas de souffrance de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Si les signes de souffrance persistent, les animaux seront euthanasiés.

**9518** Il est parfois nécessaire de localiser les zones inflammatoires chez les patients, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques (polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose, maladies inflammatoires chroniques intestinales,

etc). A cet effet, l'imagerie par scintigraphie a montré son intérêt, en particulier la scintigraphie au FDG (18F fluorodésoxyglucose), qui permet de visualiser le métabolisme glucidique : ceci repose sur le fait que les sites d'inflammation sont denses en cellules ayant un métabolisme glucidique accru.

L'athérosclérose est également une maladie inflammatoire chronique. Cette affection est extrêmement courante et peut conduire à des complications graves (accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde). Dans cette affection, la visualisation de l'inflammation dans les artères pourrait permettre de guider le traitement et de prévenir les complications. La scintigraphie au FDG est d'ores et déjà en cours d'évaluation pour détecter les plaques instables (zones d'inflammation) sur les artères du cou (et donc évaluer le risque d'accident vasculaire cérébral). La scintigraphie au FDG présente toutefois, dans ce contexte, une limite principale : le métabolisme glucidique n'est pas spécifique de l'inflammation. Ainsi, la fixation physiologique du cerveau et du myocarde, qui sont de grands consommateurs de glucose, peut gêner l'interprétation.

Nous souhaitons développer un nouvel outil d'imagerie de l'inflammation, basé sur un peptide capable de se lier aux cellules en conditions inflammatoires. Alors que le FDG cible non spécifiquement toutes les cellules exerçant une activité métabolique intense (dont le cerveau, le myocarde.), le peptide CD31 ne se lie qu'à certains types cellulaires, lorsqu'elles ont été activées : cellules endothéliales, leucocytes et plaquettes. Le peptide devrait donc permettre de marquer avec plus de précision des sites inflammatoires associant inflammation des vaisseaux et des leucocytes, comme par exemple dans l'athérosclérose, mais également tous les sites où des leucocytes activés sont recrutés, comme les sites infectieux, avec moins de bruit de fond que la scintigraphie au FDG car seules les cellules activées par l'inflammation sont ciblées, et non pas toutes les cellules métaboliquement actives.

Notre but est ici d'établir, dans un modèle pré-clinique in vivo, la preuve de concept que ce peptide permet de détecter des sites d'inflammation par scintigraphie. Nous nous placerons pour cela dans un modèle d'inflammation aigue induite par injection intramusculaire d'huile de turpentine chez le rat, un modèle bien établi dans la littérature.

Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 21 rats, pour une durée de 2 ans, en respectant le principe des 3R. Remplacement : des tests in vitro ont déjà permis d'établir que le peptide se fixait aux cellules en conditions inflammatoires, il est désormais nécessaire de le tester in vivo chez l'animal. Réduction : l'utilisation de contrôles internes à chaque rat (comparaison dans un même animal de la radioactivité dans le site inflammatoire et dans un site contrôle), permettront de diminuer le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement, avec une surveillance scrupuleuse de l'état de santé des rats par les opérateurs et les responsables du bien être animal en plus des soins standards. Les rats recevant une injection d'huile de turpentine seront examinés tous les jours afin de détecter une douleur éventuelle. Les expériences d'imagerie seront réalisées sous anesthésie, avec confort thermique et monitoring du rythme respiratoire.

**9519** La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire et évoluant par poussées aiguës entrecoupées de périodes de rémission. Le nombre de patients s'élève environ à 1 million aux Etats Unis et 1 million en Europe dont 120 000 cas en France. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif.

L'étiologie de la maladie de Crohn reste à ce jour mal connue. Toutefois, les études cliniques et épidémiologiques ont permis de montrer qu'elle est multifactorielle faisant intervenir des facteurs environnementaux, des facteurs génétiques et des agents infectieux.

Il est clair depuis quelques années maintenant que les patients souffrant de la maladie de Crohn présentent des déséquilibres de la composition bactérienne de leur flore intestinale appelés dysbioses. Il a ainsi été rapporté chez ces patients une augmentation du nombre d'espèces potentiellement pro-inflammatoires ainsi qu'une diminution du nombre d'espèces potentiellement anti-inflammatoires. Les patients présentent notamment une surreprésentation des *Escherichia coli*.

Ces E. coli pro-inflammatoires, ont la capacité d'envahir les cellules, d'y survivre et de s'y multiplier. Ces E. coli ont été appelé AIEC pour « adherent-invasive E. coli ».

En ce qui concerne les facteurs génétiques, le gène ATG16L1 retient toute l'attention. Il est retrouvé fréquemment muté chez les malades et code pour une protéine clef du processus autophagique, un processus biologique permettant d'éliminer les protéines mal repliées, les vieilles organelles... Depuis quelques années nous savons aussi que l'autophagie permet l'élimination des bactéries pathogènes intracellulaires et qu'une autophagie fonctionnelle est nécessaire au contrôle de la réplication intracellulaire des AIEC.

Etant donné l'importance du gène ATG16L1 dans le contrôle direct ou indirect de la prolifération bactérienne, nous avons émis l'hypothèse que son défaut d'expression pouvait entraîner une dysbiose et ainsi participer à l'apparition d'un terrain pro-inflammatoire.

Le présent projet vise à étudier le rôle d'ATG16L1 dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection par des AIEC et le contrôle de la composition du microbiote intestinal en réponse à l'infection par ces bactéries. Pour cela, nous disposons d'un modèle de souris dont l'expression d'ATG16L1 a été génétiquement invalidée spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales ou dans les cellules immunitaires. Nous nous intéressons à ces deux types cellulaires car il est connu que les AIEC ciblent ces cellules. Des souris possédant le gène ATG16L1 ou chez lesquelles le gène ATG16L1 aura été invalidé seront infectées ou non avec une souche clinique d'AIEC ou avec une souche de E. coli contrôle non pathogène. Ensuite, nous analyserons chez les animaux la composition de leur microbiote intestinal ainsi que le taux de colonisation des E. coli et l'inflammation intestinale.

Sur la durée du projet qui est de 5 ans, nous utiliserons 180 souris. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier le microbiote intestinal, la colonisation bactérienne ainsi que la réponse inflammatoire. Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture. De plus le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en carton.

Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé afin de limiter le nombre d'animaux utilisé. Les données que nous possédons sur l'infection de souris avec des AIEC indiquent que l'inflammation induite reste très modérée chez l'animal tout comme les diarrhées. Nous suivrons quotidiennement les souris. Si besoin, les animaux seront traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien, tel que le paracétamol, qui sera administré par gavage. Le poids des souris sera également suivi avec attention car il reflète bien l'inflammation intestinale et la sévérité d'une diarrhée. Une perte de plus de 15% du poids initial constituera un critère d'arrêt. L'animal en question sera euthanasié.

**9520** La prévalence des maladies associées à un déséquilibre alimentaire comme l'obésité s'est accrue de manière épidémique dans les pays développés. Compte tenu du lien étroit entre ces pathologies et les maladies métaboliques, cela pose un grave problème de santé publique. Résultant d'un déséquilibre entre calories ingérées et dépensées, l'excès de poids a souvent pour origine une perturbation du comportement alimentaire et/ou du métabolisme énergétique. Bien que les parts environnementale et génétique jouent un rôle indéniable dans ces perturbations, on sait maintenant que le comportement alimentaire et le métabolisme énergétique nous sont, en partie, dictés par notre héritage épigénétique. Ainsi l'alimentation d'un individu influencerait non seulement l'expression de ses propres gènes mais également celle des gènes de sa descendance. La transmission d'un caractère (phénotype) nouvellement acquis est un mécanisme relativement nouveau en biologie et ferait intervenir des mécanismes non-génétiques (épigénétiques). Ces dernières années, nous avons fait des avancées importantes dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliquées dans ce processus, d'hérédité épigénétique, en montrant d'une part qu'un stress environnemental pouvait modifier l'épigénome du spermatozoïde et que d'autre part ces modifications pouvaient être transmises à la descendance. L'objectif de la présente application est d'utiliser un modèle expérimental murin choisi, la souris, afin d'identifier ces modifications épigénétiques. Pour cela des souris mâles âgés de 3 semaines seront soumis à des régimes déséquilibrés (nourriture enrichie en graisse OU riche en protéine) pendant une période de 3 mois. Les spermatozoïdes de ces souris seront prélevés et les modifications épigénétiques nouvellement induites par un changement de nourriture seront recherchées.

Notre travail porte sur la transmission paternelle de caractères nouvellement acquis sur un mammifère. Etant donné que les mécanismes moléculaires de ce type d'hérédité ne peuvent être analysés *in vitro*, nous utilisons parallèlement à notre modèle murin et en collaboration un modèle non-vertébré, *c. elegans*. Ce modèle nous permet d'étudier certains aspects des mécanismes moléculaires de cette hérédité (Remplacement). Cependant, ce modèle a des limites. Il n'est, notamment, pas possible d'analyser certaines modifications épigénétiques majeures chez les mammifères mais absence chez le ver comme la méthylation de l'ADN. Afin de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, nous avons réalisé un calcul de puissance, test qui permet de minimiser le nombre d'échantillons et donc d'animaux nécessaires pour valider ou non notre hypothèse de départ (Réduction). Dans un souci de Raffinement, nous mettons en place toutes les dispositions permettant de minimiser les souffrances éventuelles qui pourraient être associées à nos expériences. De plus, les animaux seront observés hebdomadairement pour pouvoir détecter d'éventuels problèmes. Des analyses moléculaires et histologiques seront ensuite réalisées sur chaque souris. Nous prévoyons utiliser au plus 180 souris pour l'ensemble de ces travaux.

**9521** L'intervention sur l'activité des nerfs périphériques, dans le but de modifier l'activité du système immunitaire, est une stratégie thérapeutique en émergence. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques avec des micro- stimulateurs implantés sur le nerf vague est réalisée chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques tels que la polyarthrite rhumatoïde. De nouvelles approches sont alors envisageable dans d'autres maladies immunitaires inflammatoires comme les inflammations cutanées comme le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la colite inflammatoire. Ces affections chroniques ne se guérissent pas et se caractérisent par des phases de poussées et de remissions. Les traitements actuels reposent sur l'utilisation d'agents anti-inflammatoires comme les corticoïdes qui sont souvent associée à une immunosuppression généralisée induisant des effets secondaires importants.

L'utilisation de l'électrostimulation pour traiter cette maladie pourrait représenter une stratégie alternative d'autant plus pertinente que nous avons montré que la stimulation des nerfs splénique inhibe la sécrétion de TNF dans le sang. Or le TNF est une cytokine très importante impliquée dans le développement des deux maladies que nous ciblons : le psoriasis et la colite inflammatoire.

Nous cherchons donc dans ce projet à évaluer les effets de l'électrostimulation des nerfs spléniques sur le développement du psoriasis et de la colite inflammatoire dans un modèle murin. Le projet consiste à :

- 1- implanter une électrode de stimulation au niveau du nerf splénique chez la souris ;
- 2- puis induire un psoriasis ou une colite expérimental par administration d'un agent chimique connu pour déclencher ces maladies ;
- 3- et enfin appliquer ou non des sessions d'électrostimulation.

La comparaison de l'inflammation entre les animaux ayant subi une électrostimulation (groupe expérimental) et ceux n'ayant pas subi cette électrostimulation (groupe contrôle) nous permettra de déterminer l'effet de l'électrostimulation sur le développement psoriasis et de la colite inflammatoire. Une fois l'effet thérapeutique établi, les effets sur les populations lymphocytaires d'une part et le mécanisme d'action d'autre part seront recherchés.

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 1404. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, des notions de raffinement sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire.

**9522** L'utilisation de dispositifs médicaux (DM) a permis d'améliorer significativement la santé et la qualité de vie des patients. Ces dispositifs médicaux ne permettent pas d'échapper aux risques d'infection et encore moins de les résoudre. Les infections relatives à la pose d'implants en chirurgie sont des problèmes cliniques sérieux induisant un taux de mortalité élevé. Les bactéries responsables de ces infections sont dans plus de 50% des cas *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*. Le traitement

consiste à remplacer l'implant et à administrer un antibiotique oral pendant une longue période. Cependant, les protocoles de traitement antibiotique standards présentent une faible efficacité pour ce genre d'affections et l'intervention chirurgicale est souvent complexe pour éliminer l'infection, voire de changer d'implant. Ces pratiques représentent un risque élevé pour le patient et un coût non négligeable pour la société. En effet, les bactéries se fixent sur ces matériaux et les antibiotiques par voie orale restent donc inefficaces. C'est pour cette raison qu'un système local de délivrance de médicament est une alternative intéressante pour pallier ces difficultés. De tels systèmes existent déjà mais sont basés soit sur la dissolution d'antibiotiques dans des ciments et leur délivrance par un phénomène de diffusion, soit par leur dispersion dans des matrices polymères biodégradables. Les désavantages de telles approches sont : la délivrance continue du médicament et une quantité non négligeable d'antibiotiques reste piégée dans les réseaux polymères. La libération d'antibiotiques est contrôlée par une variation de pH dans l'environnement des implants osseux typiquement observée en cas d'infection bactérienne. Une étude chez le porc de 3 mois sera mise en place pour évaluer l'efficacité du traitement antibiotique de surface sur les infections à *S. aureus* (souche sensible aux antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine) suite à une intervention. Des ostéotomies partielles (réalisation chirurgicale d'un trou cylindrique au niveau de l'os permettant la pénétration des bactéries) seront réalisées sur des porcs sur plusieurs expérimentations distinctes.

Pour la mise au point du modèle infectieux avec ou sans implant et l'étude de la tolérance des implants dans le tissu osseux, il y aura 35 porcs utilisés. Les porcs sont répartis en lots : (i) des lots de porcs ostéomisés, infectés et traités, sans ou avec des vis métalliques modifiées sans coating et (ii) lots de porcs témoins ostéomisés, non infectés et non traités. Les suivis post-opératoires consisteront à un examen clinique et comportemental journalier (comportement général, appétit, fièvre, douleur, gonflement et/ou rejet au niveau de l'opération et poids). Des analyses hématologiques seront effectuées afin de suivre les variations des populations sanguines, ainsi que le taux de fibrinogène. Afin de mieux visualiser le devenir des biomatériaux et de l'infection, de l'imagerie in vivo (scanner et IRM) sera programmée une fois par semaine sur une période de 21 jours. En fin d'expérience, des prélèvements seront effectués au niveau du site opératoire pour estimer la charge bactérienne à *S. aureus* et des analyses histopathologiques pour voir l'impact du *S. aureus* et de la dispersion des antibiotiques sur les tissus.

Remplacement : L'infection osseuse à *S. aureus* et la pose d'implants, étant difficiles à modéliser in vitro, le modèle animal est indispensable en vue d'une transposition chez l'Homme.

Réduction : Ce projet est une preuve de concept pour déterminer la tolérance de l'os à l'implant et le choix de la dose infectieuse et de la souche de *S. aureus*. La pose d'implants a été randomisée selon un plan d'expériences afin de limiter le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en répondant aux questions scientifiques.

Raffinement : les porcs seront sous anesthésie générale durant l'intervention chirurgicale et recevront un traitement permettant de contrôler la douleur; sous supervision vétérinaire et zootechnique pendant 7 jours post-opératoire. Il y aura un enrichissement social (hébergement, groupe/visites animalières) et environnemental (ballon, chaînes). L'utilisation de l'imagerie (CTscan et IRM) permettra de faire le suivi post-opératoire de manière non invasive et sans douleur pour l'animal.

**9523** L'expansion inquiétante de l'obésité, souvent associée à un diabète de type 2, est notamment due à une alimentation hypercalorique riche en graisses. La qualité du régime alimentaire peut être améliorée, en réduisant les apports en graisses et en sucres rapides, et en augmentant notamment les apports en protéines et en fibres alimentaires. L'effet bénéfique des protéines est connu par un effet « coupe faim » alors que les fibres améliorent notamment la sensibilité à l'insuline et réduisent les taux à jeun de cholestérol sanguin chez des sujets sains, ainsi que chez des sujets obèses et diabétiques. Tout le long de l'intestin et en particulier au niveau du côlon, le métabolisme intestinal va fournir des produits de dégradation des protéines ou des fibres qui pourraient être utilisés comme substrats de la production de glucose par l'intestin (PIG). La PIG est détectée par le système nerveux central comme un signal métabolique bénéfique pour l'organisme, résultant notamment par une augmentation de la satiété et de la dépense énergétique, ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline.



Une étude récente a montré que la fermentation des fibres alimentaires par la flore bactérienne intestinale entraîne la production de succinate, identifié comme substrat de la PIG. De plus, le succinate améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline chez les souris contrôles, et ses effets sont absents chez les souris dépourvues de PIG.

L'objectif de cette étude est de montrer si des produits du métabolisme intestinal ou de la fermentation bactérienne intestinale peuvent avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique et le contrôle glycémique en induisant la PIG. Afin d'observer plus facilement des effets bénéfiques sur l'organisme, nous nous placerons dans le contexte d'un régime délétère en nourrissant les souris avec un régime riche en gras et en sucres (High Fat/High Sucrose=HF/HS) pendant 4 semaines. Cette durée est néanmoins insuffisante pour entraîner l'apparition d'un état pathologique (obésité ou diabète).

L'ensemble des procédures sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Le recours à l'animal ne peut être évité puisque cette étude implique une réponse intégrée de l'ensemble de l'organisme. En effet, le métabolisme glucidique et énergétique doit être mesuré in vivo, comme chez l'homme, par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, des mesures de glycémie et un suivi de poids et de prise alimentaire.

Par souci de raffinement des procédures, seuls les métabolites pour lesquels nous observons des effets métaboliques bénéfiques chez les souris contrôles seront testés chez des souris dépourvues de PIG. Cette expérience nous permettra de déterminer si les effets sur les paramètres étudiés sont dépendants d'une induction de la PIG. De plus, les souris dépourvues de PIG ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles. D'autre part, les souris seront élevées et hébergées par groupe de 2-3 souris par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (hypoglycémie, perte de poids, ...). Le suivi du bien être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance.

Le nombre total d'animaux, soit 144 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous effectuerons certains tests sur les mêmes souris, à une semaine d'intervalle entre chaque test.

Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques notamment en enrichissant le régime des personnes obèses et/ou diabétique en certains métabolites afin d'améliorer leur métabolisme.

**9524** La sténose valvulaire aortique calcifiée est une maladie très fréquente (plus 10 000 remplacements valvulaires aortiques en France en 2016). Elle touche essentiellement la population âgée, et l'une des solutions les plus fréquemment proposée est le remplacement de la valve aortique par une prothèse valvulaire artificielle. Celle-ci peut être mécanique en carbone pyrolytique mais un traitement anticoagulant à vie est alors nécessaire pour éviter tout risque d'embolie. Il existe des bioprothèses constituées de péricarde bovin ou porcine : ces biomatériaux sont couramment utilisés, ainsi le péricarde (membrane très fine qui entoure le cœur), est utilisé comme matrice pour la fabrication de valves ou de prothèses en chirurgie cardio-vasculaire depuis plus de 30 ans. La pose de ces bioprothèses ne nécessite pas de traitement anticoagulant. Elles ont tendance néanmoins à se calcifier avec le temps, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre leur devenir après implantation. L'étude de l'évolution (notamment la calcification), du péricarde bovin, au long terme, ne peut se faire que sur l'animal vivant, en raison de la complexité des interactions entre les cellules, le milieu environnant et l'implant. Il s'agit d'un complément indispensable aux études effectuées in vitro par des techniques de culture cellulaire.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer le devenir du péricarde bovin en termes de calcification, dégradation et recolonisation par les cellules du tissu environnant. Nous implanterons des disques de péricarde bovin en sous cutané sur le dos de rats pour une durée de 30 jours. Cette étude portera sur 160 rats au total : 80 rats immunocompétents et 80 rats immunodéprimés qui permettront de s'affranchir de la réaction immunitaire et d'étudier la recolonisation du péricarde par prétraitement de celui-ci par des cellules progénitrices endothéliales circulantes (PEC) humaines. Les rats seront

implantés à l'âge de 12 jours, ce qui est le modèle le plus utilisé de calcification permettant une réaction biologique rapide.

Pour respecter la règle des 3R, et donc réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le plus possible le nombre de rats utilisés en implantant 4 disques par rat. L'ensemble des procédures d'implantation sera effectué sous anesthésie générale afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Les rats seront régulièrement surveillés avec un score de suivi permettant de détecter une éventuelle souffrance animale. Des points limites ont été établis qui entraînent l'euthanasie anticipée de l'animal si besoin. L'explantation se fera en post mortem afin de ne pas causer de risque de souffrance. Ce travail permettra de mieux comprendre le devenir des bioprothèses en péricardes implantées sur le long terme. Il apportera des informations importantes sur la recolonisation de ces tissus par les cellules de l'hôte et les moyens d'optimiser leur utilisation pour remplacer des valves cardiaques déficientes.

**9525** La chirurgie de certaines tumeurs du crâne peut entraîner une paralysie faciale. Le nerf facial naît au niveau du tronc cérébral dans la région de l'angle ponto-cérébelleux à la partie inférieure du cerveau. Il contrôle les muscles de la moitié du visage et participe aux fonctions du goût sur la face latérale de la langue et à la sécrétion des larmes.

Une lésion du nerf facial entraîne une paralysie faciale avec des conséquences graves sur la qualité de vie des patients notamment des difficultés pour parler, manger et cligner des paupières, ce qui peut conduire à une sécheresse oculaire, des lésions cornéennes, voire une perte de la vision de l'œil atteint.

Le traitement de référence actuel reste l'ablation chirurgicale de la tumeur mais la préservation anatomique et fonctionnelle du nerf facial pendant l'opération est toujours difficile, même pour des chirurgiens expérimentés.

Afin d'aider le chirurgien, un système de surveillance de la fonction du nerf (monitorage peropératoire) est mis en place grâce à des électrodes placées dans les muscles du visage du patient endormi mais cette technique doit être améliorée. Un nouveau système, qui propose une surveillance étroite et continue des nerfs pendant toute la procédure chirurgicale, a fait ses preuves dans la préservation de la fonction des nerfs innervant les muscles des cordes vocales au cours de la chirurgie de la thyroïde. Ce projet vise à évaluer ce système chez l'animal pour surveiller le nerf facial dans la chirurgie des tumeurs de l'angle ponto-cérébelleux.

Le porc est le modèle animal le mieux adapté car son cerveau permet des manipulations microchirurgicales et l'utilisation du même matériel chirurgical que chez l'homme, le nombre d'animaux nécessaire est estimé à 10.

Au cours d'une unique intervention chirurgicale sous anesthésie générale et antalgiques, des stimulations mécaniques et thermiques des nerfs crâniens autour du tronc cérébral seront réalisées avec enregistrement continu des données.

La règle des 3 « R » a été prise en compte dans la conception du protocole de recherche :

1) « Remplacement » : il n'existe pas d'alternative à l'animal compte tenu de la nécessité d'effectuer des mesures électrophysiologiques

2) « Réduction » : Chaque animal sera opéré des deux côtés. Un enregistrement continu des données permettra d'analyser les phénomènes a posteriori sans avoir recours à des animaux supplémentaires.

3) « Raffinement » : L'ensemble de la procédure s'effectuera sous anesthésie générale avec une analgésie peropératoire et surveillance des signes de douleurs. L'animal sera euthanasié en fin de procédure sous anesthésie générale.

Il est nécessaire de développer et valider des outils pour assister le chirurgien et améliorer les résultats de la technique actuelle dans cette pathologie.

**9526** La formation des chirurgiens nécessite des apprentissages pratiques aussi bien que théoriques : après de nombreuses séances d'observation vidéos, des simulations de chirurgie sur des pièces anatomiques et des substituts, il est encore nécessaire de recourir à des séances de formation avec des animaux vertébrés pour se retrouver dans la situation d'un tissu vivant, mobile et vascularisé.

Les chirurgies utilisant des dispositifs conçus pour l'homme, tels que les instruments de coelioscopie, peuvent être réalisées avec des porcs, dont la taille des organes et l'anatomie générale est proche de l'homme.

Ces séances sont réalisées en nombre limité après des enseignements sur simulateur, dans le cadre d'un programme de formation. Un total de 650 animaux est prévu sur 5 ans pour l'ensemble des formations initiales et continues des chirurgiens dans plusieurs domaines d'application médicale courante, telle que la chirurgie viscérale, urologique et traumatologie, ou encore pour l'apprentissage de nouveaux dispositifs. Ce nombre est un maximum et prend en compte nos besoins actuels et leur évolution probable durant la période.

Le bien être des animaux est respecté par une manipulation adaptée de sujets habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont euthanasiés sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. Le nombre d'animaux est réduit au minimum grâce à une gestion soigneuse des actes pratiques réalisés par chaque stagiaire.

De plus afin de réduire le recours à l'animal vivant, nous réalisons post mortem des prélèvements de tissu-organe-bloc multi tissulaire à destination de recherche (mise en culture, greffe, pharmacologie) et d'enseignement pour les étudiants en début de cursus.

**9527** Ce dossier constitue un amendement au dossier préalablement autorisé.

La transplantation fait actuellement face à différents problèmes : manque d'organes avec des listes croissantes de patients en attente de greffe dont certains meurent avant de se voir proposer un organe. Le rejet à plus ou moins long terme du greffon constitue également un problème. Enfin certains immunosuppresseurs, empêchant le rejet d'organe présentent des effets secondaires importants à long terme. Différents modèles de recherche chez le primate-non-humain (PNH) peuvent mimer parfaitement des situations cliniques connues chez l'homme et permettent ainsi de tester différents protocoles thérapeutiques innovants en conditions pré-cliniques.

Les inhibiteurs de calcineurine (CNI), molécules immunosuppressives, montrent actuellement une amélioration de la survie du greffon à 1 an, mais cette amélioration n'est plus vraie à 5 ans post-greffe. Cette différence de survie est principalement due à la néphrotoxicité des CNI utilisés à forte dose et également à l'apparition des anticorps antidonneurs (préjudiciables au devenir du greffon) lorsque que les CNI sont utilisés à faible dose. De plus, la plupart des traitements utilisant des CNI sont associés au développement d'effets secondaires chez les patients transplantés tels que l'hypertension, l'hyperlipidémie, l'intolérance au glucose et la néphrotoxicité. C'est pourquoi, le projet développé ici s'inscrit dans une stratégie de réduction ou de remplacement des CNI par une molécule innovante en transplantation d'organe.

La molécule que nous souhaitons tester dans le modèle de transplantation rénale chez le primate, est un inhibiteur de Phosphatidylinositol- 4-Kinase (PI4Ki). Cette molécule a préalablement été testée dans différents tests fonctionnels in vitro, montrant une inhibition des diverses réponses immunes. L'inhibiteur de PI4K a également été testé chez 2 modèles murins différents, montrant une prolongation de la survie du greffon cardiaque et ainsi que de la greffe de peau. Des études d'immunisation chez le PNH ont également montré que cette molécule inhibait la réponse immune primaire empêchant la production d'anticorps. Dans ce projet, nous souhaitons tester de façon pré-clinique, en nous appuyant sur nos précédents résultats, cette molécule comme immunosuppresseur dans un modèle de transplantation rénale chez le PNH (macaques), dans une hypothèse 1) de réduction et/ou 2) de remplacement du traitement néphrotoxique (inhibiteur de calcineurine). Dans ce but, la molécule innovante sera utilisée à différentes doses, en combinaison avec 2 immunosuppresseurs différents actuellement utilisés chez les patients transplantés rénaux : un inhibiteur de calcineurine (IS) (bithérapie) et une molécule antiproliférative (IS) + une molécule anti-inflammatoire (corticoïde) (trithérapie), selon des temps de traitement différents et selon une organisation de travail en 3 phases.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 32 (donneurs et receveurs d'organes compris). Dans un souci de respect de la règle des 3R, les reins d'un même et seul donneur seront greffés simultanément à deux receveurs différents. Les principes de raffinement et de remplacement contribueront à réduire le nombre d'animaux utilisés tout au long du protocole. C'est-

à-dire que les phases 1b, 2 et 3 du protocole ne seront réalisées que si les résultats obtenus au cours de la phase 1a sont conformes aux hypothèses de travail. Les groupes contrôles réalisés dans ce projet, ne seront pas refaits ultérieurement servant ainsi de contrôles historiques pour d'autres études en transplantation de rein, dans cette espèce, réalisées dans notre centre.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur des animaux, toutes les procédures de ce projet seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique sera donné à chacun de façon adaptée en fonction de la procédure. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des expérimentations et consiste en des examens cliniques de l'animal notés sous forme de score clinique selon une échelle préétablie, permettant une prise en charge individuelle et adaptée. Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental, les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

## 9528

Le projet vise à comprendre le rôle des molécules d'adhérences dans le développement normal et tumoral de l'os. L'os est un tissu complexe qui est composé d'une part des cellules ostéoclastiques qui sont impliquées dans la résorption de l'os et les ostéoblastes impliquées dans le dépôt de l'os. Nous nous intéressons plus spécifiquement aux cellules ostéoblastiques. En effet ces cellules sont très sensibles au changement des propriétés physico-chimique de l'environnement afin de contrôler le dépôt de la matrice osseuse.

L'intégration des signaux provenant de l'environnement font intervenir des protéines présentes à la surface des cellules. Nous utilisons un système d'inactivation de gène uniquement dans les cellules ostéoblastiques visant à supprimer l'expression de ces récepteurs membranaires. Comme nous nous intéressons à voir comment ces récepteurs peuvent influencer le développement de la tumeur osseuse nous croisons ces souris avec d'autres souris présentant des tumeurs osseuses.

Ce modèle de travail est unique est ne peut en effet se faire que dans le modèle murin ou la manipulation des gènes d'intérêt nous permet de d'inactiver les récepteurs de l'adhérence cellulaire dans un modèle animal de tumeur osseuse.

REDUIRE : Notre objectif est de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. En effet nous utiliserons un nombre minimum d'animaux vivants, nous prévoyons d'utiliser 50 animaux sur 3 ans, dont la moitié seront des contrôles qui ne seront pas soumis à la mutation complète.

REMPLACEMENT : la première phase d'analyse de ce projet porte sur l'étude de cellules in vitro. L'utilisation du modèle animale est réduit pour la partie essentielle qui est la confirmation des résultats obtenue in vitro chez l'animal dans un contexte intégré. Le modèle animal est nécessaire pour l'étape de confirmation dans un système plus physiologique qui a pour but de reproduire la pathologie humaine

RAFFINER : nous ne savons pas ce que va provoquer la mutation dans un contexte de développement de la tumeur. La gravité maximale est donc modérée. Des points limites sont définis par l'intermédiaire d'une grille de score (mouvement, poids...). Nous interviendrons par l'euthanasie des animaux avant toute pathologie, quelle qu'elle soit.

Nos points limites sont conçus pour minimiser la souffrance ou la gêne des animaux. Les animaux porteurs des tumeurs seront euthanasiés avant l'apparition de signes cliniques manifestes.

## 9529

Projet :

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus ou moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleur pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS

pour Microsatellite Stable) caractérisés par des mutations dans la structure des chromosomes (instabilité chromosomique).

L'objectif de ce projet est d'étudier les conséquences de l'inactivation du système MMR spécifiquement dans l'épithélium colique pour pouvoir investiguer par la suite le rôle de différentes mutations sur le développement des cancers coliques MSI ainsi que la réponse à la chimiothérapie.

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 120 souris transgéniques au maximum pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

**9530** Dans le cadre de la recherche contre le cancer visant à définir les meilleures conditions d'utilisation d'un traitement innovant en clinique chez les patients, des études pré-cliniques de pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) sur l'animal permettent d'étudier la biodistribution, le cheminement et l'élimination de l'organisme des traitements administrés.

La PK ou ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) permet de déterminer comment l'organisme distribue et utilise un traitement, alors que la PD analyse les effets du traitement sur l'organisme (ex : toxicité, effets secondaires).

Pour effectuer ces analyses, des animaux porteurs de tumeurs humaines ou PDX (Patient-Derived Xenograft) sont utilisés spécifiquement pour recevoir des traitements à différentes doses et suivant différents schémas et/ou voies d'administration. La présence d'une tumeur peut potentiellement perturber les paramètres de PK/PD des molécules évaluées. Il est ainsi important de travailler dans des modèles reproduisant le contexte tumoral observé chez les patients en clinique.

Une fois le traitement administré, des prises de sang à des temps donnés en fonction des types de molécule sont réalisées sur les animaux pour déterminer la propagation de cette molécule dans l'organisme (analyse pharmacocinétique). Puis pour compléter les prélèvements sanguins, les animaux sont euthanasiés afin de prélever des organes et tissus nécessaires aux analyses de pénétration et de distribution de cette molécule dans les tissus et la tumeur (analyse pharmacodynamique). La procédure expérimentale nécessite 63 animaux au maximum.

Ce projet est un ensemble de 40 études basées sur la même procédure expérimentale : greffe-traitement-prélèvements. Ces 40 études différeront sur le modèle tumoral utilisé, les traitements administrés (doses, schéma et voie d'administration) et les temps de prélèvements, ainsi que les tissus prélevés. Ce projet se déroulera sur 2 ans et comprendra au maximum 2520 animaux (40\*63). Ce nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des modèles tumoraux utilisés.

Concernant la règle des 3Rs, ces prélèvements ne peuvent être réalisés qu'à partir d'organisme entier pour étudier leur parcours de l'administration à l'élimination et donc l'utilisation de l'animal ne peut pas être remplacée à ce jour.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux et d'obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet

auront été sélectionnés au préalable lors d'étude in vitro permettant la réduction du nombre de groupe à tester. Toujours d'après les résultats in vitro, seuls les traitements démontrant les meilleurs effets seront testés in vivo permettant au mieux de raffiner ces études. Le nombre de prélèvements et la quantité prélevée par animal, ainsi que les temps de récupération suivent les critères éthiques et permettent de conserver une bonne qualité du bien être animal. Pour finir, l'observation au minimum quotidienne des animaux d'un point de vue comportemental et physiologique permet de détecter rapidement tout signe de souffrance ou de détresse et d'appliquer les mesures nécessaires.

**9531** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17% des décès (Organisation Mondiale de la Santé, 2012). En France elles causent chaque année 150 000 morts, dont 27% associés à un infarctus et 23% à l'insuffisance cardiaque (Société Française de Cardiologie, 2015). Avec plus de 28 milliards d'euros de dépenses annuelles directement imputables, elles restent un problème majeur de santé publique et un enjeu thérapeutique prioritaire. Longtemps focalisée sur la protection du cœur dans la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, notre recherche se concentre aujourd'hui sur ses conséquences au long cours, renommée « dysfonction cardiaque post-ischémique », et sa transition vers l'insuffisance cardiaque symptomatique. Avec un arsenal thérapeutique actuel restreint dans cette dernière indication, notre objectif est de prévenir ou ralentir son évolution fatale, en limitant la survenue d'arythmie cardiaque grave, à l'origine de mort subite.

Le rythme cardiaque est régi par des impulsions électriques qui circulent dans le cœur et déclenchent une contraction coordonnée de ses différentes structures (oreillettes, ventricules). Les troubles du rythme sont des anomalies de ce système de conduction à l'origine d'une activité cardiaque plus rapide (tachycardie), plus lente (bradycardie) ou irrégulière (arythmie). S'ils se développent aussi chez l'adulte sain, la majorité de ces troubles est associée à une maladie cardiaque sous-jacente. En France on estime que près de la moitié des décès liés à l'insuffisance cardiaque sont dus à des arythmies ventriculaires graves conduisant à la mort subite (Fondation pour la Recherche Médicale, 2014). Le défibrillateur automatique implantable, qui détecte la survenue d'arythmie et applique une décharge électrique, est aujourd'hui la thérapie standard pour la prévention de la mort subite. Cependant un traitement complémentaire anti arythmique additionnel au défibrillateur implanté reste nécessaire pour limiter la survenue des troubles et réduire l'intervention intempestive du dispositif.

Dans ce contexte nous chercherons ainsi à mettre au point un modèle aigu d'arythmie ventriculaire et de réanimation par défibrillation automatique, in vivo, étape essentielle afin d'évaluer l'efficacité de candidats médicaments, dans un environnement similaire au modèle humain (pharmacocinétique, physiologie cardiovasculaire, expression de la cible d'intérêt, ...) et difficilement remplaçable par des modèles informatiques (in silico) par exemple. A ce stade seuls les candidats ayant montré une sélectivité optimale in vitro et une sécurité in vivo, seront susceptibles d'être évalués.

Expérimentalement les troubles du rythme seront induits chez le porc sain et anesthésié tout au long de l'étude et sans réveil consécutif, à l'aide d'un protocole de stimulation ventriculaire programmée (identique à celui utilisé chez certains patients) pour évaluer le risque arythmique. Un protocole de défibrillation sera immédiatement mis en place dès l'induction du trouble via un dispositif automatique implantable, identique à ceux utilisés en clinique. L'objectif est ensuite de répéter ces protocoles dans un contexte expérimental aigu reconnu pour moduler notre cible d'intérêt (pharmacologie, pathologie) afin de valider son implication dans l'arythmie ventriculaire. Ce modèle établi nous permettra enfin d'évaluer la capacité de candidats médicaments à limiter l'induction de troubles du rythme et/ou à améliorer les paramètres de défibrillation. Nous comparerons leur efficacité à ceux de traitements de référence et spécifiques de la cible d'intérêt.

A l'issue de ce projet le candidat ayant montré la plus grande preuve d'efficacité anti arythmique dans ce modèle aigu sera réévalué dans un modèle chronique d'insuffisance cardiaque « post infarctus » chez le porc au cours duquel les mêmes protocoles de stimulation et de défibrillation seront appliqués (dans le cadre d'un autre projet autorisé).

Ce projet s'intègre dans l'évaluation pharmacologique d'un candidat médicament. L'administration au porc constitue ainsi une étape essentielle dans le processus de sélection. Le comportement de la molécule au sein d'un organisme proche de l'Homme est donc indispensable dans la prédictivité vers un modèle pré-clinique et clinique. De plus, l'utilisation du porc dans la Recherche pharmacologique

se justifie par une physiologie cardiovasculaire semblable à celle de l'Homme (fréquence cardiaque, hémodynamique, électrophysiologie), une anatomie propice à la réalisation de gestes techniques/chirurgicaux de précision et à l'utilisation de dispositif clinique, et une similitude dans le système digestif et le métabolisme des médicaments.

Tous les dispositifs et protocoles utilisés dans ce projet (électrode de stimulation, pacemaker, protocole de stimulation, défibrillateur implantable) sont tous d'usage clinique et ont tous montré une efficacité et une sécurité chez l'Homme. Avant l'expérimentation les animaux seront maintenus en phase d'acclimatation pendant 2 semaines et en groupe pour maintenir une relation sociale. Les porcs sont hébergés dans des boxes enrichis de litière végétale dans laquelle leur aliment est dispersé afin de stimuler leur instinct de fouissage, ils bénéficient également de balles de jeux et d'éléments à mordiller. L'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques est nécessaire pour réduire au minimum la souffrance et le stress lors de chirurgie. Pour finir, une liste des points limites applicable à tous les mammifères utilisés dans l'établissement est suivi.

Ce projet prévoit un total de 74 porcs pour toute la durée de son autorisation (soit 5 années) avec l'intégralité de ses procédures classées sans réveil.

**9532** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde soit 30% de décès annuels. Ainsi, la régulation du taux de cholestérol circulant dans le sang est une priorité pour la prévention de ces maladies.

Cette régulation provient d'un équilibre entre i) les voies d'entrée du cholestérol (synthèse dans le foie, alimentation), ii) l'absorption du cholestérol vers le sang et iii) celles de sorties du cholestérol (stockage de cholestérol, synthèse de sels biliaires, excrétion vers les selles) et contribue à une cholestérolémie normale. Les approches thérapeutiques existantes réduisent partiellement le taux de cholestérol chez l'Homme en diminuant les voies d'entrées et d'absorption de cholestérol mais présentent des limites (30% de patients non-répondeurs et effets secondaires néfastes par ex, diabète).

Des travaux antérieurs basés sur des expériences de transferts de microbiote ont démontré que le microbiote intestinal modifie le métabolisme du cholestérol et qu'il pourrait constituer une nouvelle stratégie pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Nous savons que les bactéries peuvent favoriser les voies de sorties du cholestérol grâce aux hydrolases de sels biliaires (noté BSH), enzymes qui permettent la conversion des sels biliaires primaires solubles, synthétisés à partir du cholestérol, en sels biliaires secondaires, qui sont éliminés dans les selles humaines. Les sels biliaires primaires transformés par les BSHs doivent être remplacés par de nouveaux sels biliaires pour maintenir un niveau physiologique stable. Ces derniers synthétisés à partir du cholestérol, aboutissent ainsi à la diminution de la cholestérolémie. Cependant, le potentiel d'activité de ces enzymes du microbiote intestinal humain et de son impact sur le métabolisme du cholestérol de l'hôte n'a pas été reporté à ce jour.

Dans ce contexte, nous avons caractérisé ces hydrolases des sels biliaires de microbiotes intestinaux humains à partir de selles de donneurs sains. Ainsi, nous avons sélectionné 3 microbiotes humains qui ont une activité BSH faible et 3 ayant une activité BSH élevée.

Notre objectif sera de mieux comprendre le rôle de cette voie d'élimination du cholestérol, via l'activité des hydrolases des sels biliaires du microbiote intestinal, et de caractériser son importance dans la régulation de la cholestérolémie. Pour cela, nous allons transférer des microbiotes intestinaux de sujets sélectionnés, suivant leur niveau et leur profils d'activité, à 6 groupes de souris axéniques (dépourvues de microorganismes au sein de leur tube digestif) (n=8/ groupe), à savoir : Groupes 1, 2 et 3 = 3 microbiotes humains ayant une quantité d'enzymes active faible, groupes tests 4, 5 et 6 = 3 microbiotes humains ayant une activité hydrolase des sels biliaires élevée. Ils recevront un régime alimentaire standard au cours de cette période.

Après l'implantation du microbiote intestinal humain, il s'agira d'évaluer le potentiel du microbiote intestinal fortement producteur d'hydrolases des sels biliaires sur la cholestérolémie. Pour cette partie, les souris recevront un régime riche en cholestérol pendant 10 semaines.

Toutes ces souris seront pesées de façon hebdomadaire, le seul traitement étant constitué par le régime alimentaire riche en cholestérol. Les expériences de transplantations fécales seront réalisées par gavage orogastrique par une personne compétente. Durant l'expérience nous ferons sur toutes

les souris des prélèvements de fèces de façon naturelle (le simple fait de prendre la souris la fait déféquer naturellement), ainsi que des prélèvements de sang au niveau de la queue, au cours de l'étude pour mesurer la cholestérolémie.

Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner.

**Remplacer** : L'analyse de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie nécessite l'utilisation d'un organisme complexe et de ce fait, le recours à l'animal est indispensable. En effet, utiliser uniquement une approche in vitro exclurait la prise en compte des possibles interactions intervenant chez l'hôte.

**Réduire** : Le nombre de souris C57Bl6/J axéniques nécessaires (6 groupes x 8 souris =48) a été défini à l'aide d'études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais aussi grâce à un test de puissance afin de solliciter un nombre minimum d'animaux, tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques exploitables.

**Raffiner** : L'ensemble des souris sera réparti 4 par cage sur une durée de 81 jours durant laquelle eau et nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, humidité). Un enrichissement sera assuré par ajout de papier absorbant pour faire un nid, des bâtons de bois à ronger, de tunnels en carton et de tiges métalliques pour préserver le comportement et l'environnement naturel de l'animal. L'état de santé des animaux sera surveillé durant l'expérimentation permettant ainsi l'intervention rapide en cas de problème.

**9533** Lors d'altérations continues des pressions et débits au sein des vaisseaux, ceux-ci développent une modification durable de leurs structures pour permettre de normaliser les changements hémodynamiques : le remodelage vasculaire. Il se traduit par une correction du diamètre interne du vaisseau et de son épaisseur de paroi. Ce remodelage a été principalement décrit au niveau artériel laissant un rôle passif à la veine.

Des études réalisées par de nombreuses équipes ont permis de mettre en évidence l'importance d'une source d'inflammation corrélée au remodelage. Notamment par l'augmentation d'un recrutement des neutrophiles et des macrophages participant à la dégradation de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de métalloprotéases matricielles (MMP-9). Cependant, même si elles sont histologiquement et fonctionnellement différentes, une veine est toujours couplée à une artère. De plus, son bas débit rend possible un recrutement immunitaire. Dans ce cadre, nous voulons étudier si une interaction est possible entre la veine et l'artère par l'intermédiaire du système immunitaire. Cette collaboration sera étudiée lors du remodelage par augmentation chronique de débit, mais également lors de la mise en place de la pathologie à forte composante inflammatoire qu'est l'athérosclérose.

Nos hypothèses sont doubles. Il sera nécessaire de comprendre si la veine capte directement les modifications hémodynamiques puis interagit avec l'artère, ou si l'artère transmet d'abord l'information à la veine qui induira ensuite un recrutement immunitaire. Après avoir caractérisé l'interaction artério-veineuse, nous nous concentrerons sur la mise en place de celle-ci lors de l'athérosclérose. Il n'existe pas de méthode alternative (pas de modélisation possible de la formation de plaque d'athérome), nous souhaitons donc étudier ces mécanismes au sein de 240 souris (120 BL6/J et 120 LdlrxCD45.1). D'après notre expérience dans des modèles de ligature et afin de permettre la significativité des résultats l'inclusion de 20 souris par groupe devrait être suffisante. L'ensemble des manipulations ont été prévues et préparées dans le but de respecter la règle des 3R. De ce fait, les chirurgies seront réalisées avec l'utilisation d'un tapis chauffant, d'injections d'analgésiques et d'anesthésiques et les temps d'opération seront diminués au maximum. Par ailleurs, la souffrance animale sera particulièrement surveillée. Une grille permettant de définir un score de souffrance a été mise en place au laboratoire. L'ensemble de ces procédures nous permettront de développer notre projet scientifique dans le respect des consignes éthiques.

Ainsi, en bloquant spécifiquement la veine, nous pourrons étudier son effet sur l'évolution de la pathologie et faire de celle-ci une potentielle cible thérapeutique.

**9534** **Projet** : Les cancers primitifs du foie (carcinome hépatocellulaire et cholangiocarcinome) représentent 7000 et 2000 nouveaux cas par an en France. Ce sont deux tumeurs de très mauvais pronostic. Les



traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%). Cependant, le taux de récurrence est élevé notamment après la résection de la tumeur car le foie malade cirrhotique est laissé en place ce qui favorise l'émergence d'une nouvelle tumeur. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafénib, mais son efficacité est limitée et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Aucun traitement palliatif montrant un bénéfice sur la survie ne peut être proposé aux patients ayant un cholangiocarcinome non opérable.

Dans ce contexte, nos projets de recherche ont pour objectif de caractériser et quantifier l'activité de nouvelles combinaisons de traitement pour améliorer l'efficacité des traitements validés dans le cholangiocarcinome (GEMOX) et de tester de nouveaux médicaments pour le traitement des tumeurs hépatiques. La preuve d'activité/efficacité anti-tumorale des combinaisons ou des candidats médicaments sera faite au préalable in vitro sur des lignées humaines de cholangiocarcinome. Des évaluations seront ensuite conduites in vivo dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer hépatique chez la souris immunodéprimée.

Type d'animaux : Souris (*Mus musculus*) modèle de xénogreffe chez la souris immunodéprimée.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 788 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Chaque groupe de traitement inclura 8 souris, ce qui est le minimum pour avoir des résultats statistiquement exploitables. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

**9535** La transplantation d'organe est la seule issue thérapeutique pour la plupart des pathologies conduisant à une perte irréversible de la fonction des organes vitaux. Le greffon, l'organe transplanté, est étranger à l'organisme du receveur et engendre une réaction immunitaire dite de « rejet », aigu ou chronique, qui reste la première cause de perte de fonction du greffon à long terme. L'incidence de rejet aigu à un an après transplantation varie entre 10% (rein) et 50% (poumon) (source : Inserm). Afin d'assurer la réussite d'une transplantation (à savoir prévenir et minimiser les rejets afin de garantir une survie à long terme des greffons), le patient est soumis à un traitement immunosuppresseur visant à déprimer son immunité. Ces traitements diffèrent en fonction de la période après la greffe. Parmi les traitements dit "d'induction" administrés immédiatement après la greffe, les plus largement utilisés demeurent les Sérum Anti-Lymphocytaires (SAL) ou Immunoglobulines (IgGs) Anti-Lymphocytes ou Anti-Thymocytes (ATG, Anti-Thymocyte Globulin). Ces anticorps sont produits par l'immunisation d'animaux (IgGs de lapin actuellement commercialisées) contre des antigènes lymphocytaires humains. Cependant, ce traitement entraîne

de nombreux effets secondaires liés à l'immunisation des receveurs contre les antigènes « animaux » (ou xéno-antigènes), parmi lesquels la maladie sérique (MS) qui associe fièvre, arthralgies, et lésions au niveau de la greffe. Des travaux récents ont montré une relation entre la MS et une survie écourtée du greffon et caractérisent plusieurs antigènes impliqués dans la survenue de cette MS.

Ces travaux ouvrent la possibilité de produire un SAL innovant produit dans l'espèce porcine, par l'immunisation de porcs knock-out pour certains xéno-antigènes majeurs. Ces IgGs seraient capables de limiter la survenue des effets indésirables et parfois très graves. Cette innovation de production fait l'objet d'un brevet.

Le projet présente pour but de valider *in vivo* l'efficacité et d'évaluer l'éventuelle toxicité de ces IgGs chez le primate non humain (PNH), avant d'évaluer leur efficacité chez l'homme. Les IgGs ont préalablement été testées et validées dans des expériences *in vitro*, notamment pour l'activité cytotoxique et la cross-réactivité sur cellules de PNH. En effet, seuls les primates ont montré une cross-réactivité suffisante *in vitro*, lors de tests comparatifs avec d'autres espèces (souris, rat, lapin...).

L'objectif principal de ce projet est :

- i) de valider la cross-réactivité de ce nouveau SAL *in vivo* sur un modèle animal proche de l'homme : le macaque,
- ii) d'évaluer l'efficacité immunosuppressive de ce SAL sur le système immunitaire d'un animal immunocompétent, et
- iii) de vérifier l'innocuité *in vivo* de cette nouvelle stratégie thérapeutique.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 12. Dans un souci de respect de la règle des 3R, les études seront effectuées sur deux animaux par groupe : une première dose devrait être testée sur deux animaux, une dose supérieure ne sera testée seulement si la dose précédente ne permet pas d'obtenir des résultats escomptés, ainsi le nombre d'animaux initialement prévu pourra être revu à la baisse au cours du protocole. Les groupes utilisant les molécules de référence (contrôles) ne seront réalisés qu'en cas de résultats positifs de la molécule d'intérêt.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, tous les protocoles de ce projet seront réalisés chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des expérimentations, passant de 3 à 6 fois par jours, et consiste en des examens cliniques de l'animal notés sous forme de score clinique selon une échelle préétablie, permettant une prise en charge individuelle et adaptée.

Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

**9536** Les syndromes d'hypoventilation alvéolaire centrale sont des pathologies qui résultent de désordres neurologiques affectant les centres à l'origine de l'élaboration de la commande respiratoire. Ces syndromes englobent différentes pathologies comme le syndrome d'hypoventilation associé à une obésité précoce, le syndrome d'hypoventilation tardive associée à un dysfonctionnement de l'hypothalamus ainsi que le syndrome d'Ondine.

Le syndrome d'Ondine est la mieux caractérisée de ces affections neuro-respiratoires. Cette pathologie survient dès la naissance, et est associée à une mutation du gène PHOX2B à l'origine d'un dysfonctionnement de fonctions vitales de l'organisme. Elle est caractérisée par une abolition ou une réduction importante d'origine congénitale de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub>. Le pronostic est grave avec un taux de mortalité élevé et une dépendance à la ventilation mécanique nocturne à vie. Notre unité de recherche s'intègre dans l'un des centres de référence de cette pathologie. Dans le cadre des études cliniques réalisées au sein de notre unité, une observation a mis en évidence, chez deux patientes adultes atteintes du syndrome d'Ondine, une récupération de la chémosensibilité au CO<sub>2</sub> corrélée à la consommation de désogestrel, un puissant progestatif de synthèse. Cette observation, ajoutée aux données concluant à l'influence facilitatrice de la progestérone sur la commande centrale respiratoire et à la possibilité de potentialiser cette influence par des manipulations pharmacologiques, montre l'importance fondamentale à déterminer les mécanismes d'action du

désogestrel ou plutôt de son métabolite actif l'étonogestrel et leurs interactions pharmacologiques chez des modèles murins présentant la mutation Phox2b. Ce point est particulièrement important dans la perspective éventuelle d'utiliser ces progestatifs dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients atteints du syndrome d'Ondine.

L'objectif sera de déterminer les mécanismes impliqués dans les interactions fonctionnelles entre l'étonogestrel et la commande respiratoire chez la souris modélisant le syndrome d'Ondine via des approches non réalisables chez l'Homme. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales. Les souris transgéniques sont largement utilisées dans l'étude des mécanismes physiopathologiques d'une maladie génétique. Dans notre cas, les modèles murins transgéniques portant la mutation humaine récurrente permettent de se rapprocher des conséquences de cette mutation chez l'Homme. Les expérimentations à réaliser permettront de caractériser l'action de l'étonogestrel sur la commande respiratoire ainsi que les mécanismes impliqués. Ces expérimentations seront menées suivant 4 procédures expérimentales chez des animaux génétiquement modifiés présentant la mutation Phox2B et leur congénères sauvages (WT). Les effectifs visés sont de 20 maximum par groupe. Dès les premiers résultats, nous mettrons en œuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des procédures expérimentales. Ainsi, sur les 5 années que durera ce projet de recherche et pour les 4 procédures expérimentales visées, les effectifs envisagés sont de 920 souris au total, 880 souris nouveau-nées et 40 souris adultes, auquel il faut ajouter 80 reproducteurs (60 femelles, 20 mâles). Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour permettre la réduction des animaux utilisés et le raffinement dans les tests menés tout en assurant une puissance statistique élevée dans les tests effectués. Lorsque cela sera possible, ce seront les mêmes animaux qui seront engagés dans l'analyse de la commande respiratoire et de réseaux neuronaux modulant la respiration et dans l'analyse des populations cellulaires impliquées. Des points limites sont établis aussi bien pour les souris adultes que les souris nouveau-nées afin de réduire toute source d'angoisse et de souffrance et d'assurer le bien être animal. Le suivi des points limites et l'observation régulière de l'état général des souris permettent d'arrêter à tout moment l'expérience pour éviter l'angoisse et la souffrance de l'animal.

#### **9537** Projet :

Le carcinome hépatocellulaire est un cancer primitif du foie représentant près de 8 000 nouveaux cas par an en France et qui se classe en 5ème position en termes d'incidence au niveau mondial. C'est une tumeur de très mauvais pronostic. Les traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%). Cependant, le taux de récurrence est élevé notamment après la résection de la tumeur car le foie malade cirrhotique est laissé en place ce qui favorise l'émergence d'une nouvelle tumeur. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafenib, mais son efficacité est modeste et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Dans ce contexte, nos projets de recherche ont pour objectif de caractériser de nouveaux acteurs moléculaires du développement et de la progression du CHC afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de la transformation hépatique et à terme définir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nos analyses sont faites au préalable in vitro sur des lignées cellulaires humaines et murines de CHC. Des évaluations sont ensuite conduites in vivo dans le modèle de xénotransgreffe sous-cutanée. Chaque groupe de traitement inclura 8 souris, ce qui est le minimum requis pour avoir des résultats statistiquement exploitables et chaque série d'expérience pourra nécessiter d'être refaite une seconde fois si les résultats ne sont pas satisfaisants

Type d'animaux : Souris immunodéficientes (Nude)

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 399 souris au maximum expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au

maximum les expériences chez l'animal, qui restent cependant indispensables. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton).

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

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

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

#### **9538** Projet :

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par l'accumulation de mutations dans leur génome. Ce phénomène est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite de l'inactivation du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable de la réparation des erreurs produites pendant la réplication de l'ADN. Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleur pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par des mutations dans la structure des chromosomes (instabilité chromosomique). L'origine de cette instabilité chromosomique semble être liée aux mutations du gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui joue un rôle majeur dans le contrôle et la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (mort programmé des cellules).

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110 appelé HSP110DE9. Par des approches in vitro, nous avons démontré qu'une surexpression de la protéine mutante HSP110DE9 induit un ralentissement du cycle cellulaire et une diminution de la croissance tumorale. En plus nous avons démontré que cette surexpression sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine.

Notre objectif est d'étudier le rôle de la protéine Hsp110DE9 dans la tumorigenèse colique. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique où la mutation introduite au locus HSP110 reproduit la mutation humaine, permettant l'expression d'une protéine mutante de même nature que celle caractérisée chez les patients (HSP110DE9). Cette souris sera croisée avec la souris APC qui développe de cancer colique. Notre hypothèse est que la mutation HSP110DE9 pourrait induire une amélioration/modification du tableau clinique des animaux (ralentissement de la maladie, une augmentation de la survie, et/ou meilleure réponse aux traitements de chimiothérapie).

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 600 souris transgéniques au maximum pour une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

**9539** La prédiction des effets de l'alimentation sur la composition du lait de chèvre reste un enjeu d'élevage important, le paiement du lait dépendant du volume mais aussi de sa composition qui influence la qualité des fromages. Les principaux constituants du lait sont les lipides, les protéines et le lactose, un sucre qui régule le volume de lait produit. Le lait est sécrété par les cellules épithéliales mammaires des glandes mammaires. La production de lait dépend du bon développement de ces cellules au sein des mamelles, notamment de leur nombre, mais aussi de leurs activités de biosynthèse et de sécrétion. Une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires qui régulent la sécrétion des constituants du lait permettrait d'établir des conduites d'élevage, notamment alimentaires, permettant d'optimiser à la fois la production et la composition du lait.

Des essais d'alimentations ont montré que lorsque l'on augmente l'apport total en acides aminés des rations (apport protéique) chez les chèvres, les synthèses des trois constituants majeurs du lait, protéines, lactose et matières grasses, augmentent conjointement. Lorsque l'on augmente l'apport d'un seul acide aminé, la méthionine, seule la production de protéine pourrait augmenter. Cependant, très peu de données caractérisant les effets de la méthionine chez la chèvre sont actuellement disponibles. De plus, si les effets de l'apport protéique sur le volume et la composition du lait sont bien connus, ils restent inexplicables. L'augmentation conjointe des quantités de protéines, matières grasses et lactose produites s'explique, au moins en partie, par l'augmentation de leur biosynthèse en réponse à ces apports nutritionnels. Cependant les études de métabolisme montrent que les acides aminés seraient principalement utilisés pour la synthèse de protéines, ce qui ne permet pas d'expliquer directement les augmentations conséquentes de synthèse observées parallèlement pour les autres constituants. Une hypothèse est que cela fasse intervenir une augmentation de la sécrétion des constituants du lait via une optimisation de leur transit dans les voies de biosynthèse et de sécrétion de la cellule épithéliale mammaire.

L'essai proposé a donc deux objectifs. Le premier est d'étudier chez la chèvre les réponses de volume et de composition de lait suite à une augmentation de l'apport de méthionine à deux niveaux d'apport total en acides aminés (ou apport protéique). Le second objectif est de comprendre les mécanismes sous-jacents en analysant les mécanismes cellulaires de synthèse des constituants du lait, principalement en réponse à l'apport protéique. Un essai avec un schéma longitudinal croisant deux niveaux d'apports protéiques et deux profils en méthionine sera appliqué sur 48 chèvres en milieu de lactation (4 lots pour les 4 traitements : Bas protéine Bas Méthionine, Haut Protéine Bas Méthionine, Bas protéine Haut Méthionine, Haut Protéine Haut Méthionine. 12 chèvres par lot).

Nous suivons la règle des 3 R. Remplacer : Il n'existe actuellement aucun modèle cellulaire permettant d'étudier ces mécanismes biologiques. Réduire : par contre nous sommes attachés à réduire le nombre d'animaux nécessaires. Nous utiliserons 48 animaux pour répondre au premier objectif mais seulement 24 pour répondre au second. En effet, 48 animaux sont nécessaires pour mettre clairement en évidence les effets sur le taux protéique du lait des apports de la méthionine encore peu connue chez la chèvre. En revanche, pour étudier les mécanismes sous-jacents à l'effet de l'apport protéique, une étude statistique a montré qu'il était possible de réduire le nombre d'animaux utilisés à 24, ce nombre permettant un traitement statistique ad hoc des données. Ces animaux seront sélectionnés parmi les 48 chèvres de l'étude. Raffiner : les 48 animaux seront soumis à une conduite d'élevage et d'alimentation classique, respectueuse du bien être et bénéficieront d'un

suivi très proche par les animaliers locaux et les différents intervenants. Tous les prélèvements seront réalisés par du personnel formé et expérimenté et selon les techniques standards d'asepsie. En cas de trouble de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence.

**9540** Les artères de résistance sont les petits vaisseaux sanguins situés en amont des capillaires. Ils sont cruciaux pour la perfusion sanguine des organes vitaux avec un contrôle fin du débit et de la pression. Les vaisseaux sont soumis à des forces hémodynamiques induites par le flux sanguin. Les perturbations de flux ont un impact significatif sur la cellule endothéliale de par sa fonction et sa localisation. Un flux laminaire au niveau de la cellule endothéliale est athéroprotecteur. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés "dynamique mitochondriale" permet à la cellule de s'adapter en réponse à des contraintes physiologiques de son environnement. Cette dynamique correspond, à un équilibre entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries. Nous nous intéressons à l'implication la protéine de fusion OPA-1 dans la réponse flux dépendante des vaisseaux. Etant donné le rôle central de la cellule endothéliale dans ces mécanismes, un modèle inductible endothélial sera utilisé. La protéine de fusion OPA1 est connue pour jouer un rôle dans la cardioprotection contre les lésions d'ischémie reperfusion. Nous nous interrogeons sur le rôle d'OPA1 endothéliale comme médiateur de ses effets bénéfiques. Nous voulons étudier si des variations de flux peuvent expliquer les mécanismes protecteurs. L'athérosclérose est l'une des pathologies induisant des perturbations de flux importantes au niveau des vaisseaux, nous souhaitons étudier les conséquences de la délétion de OPA1 sur la dysfonction vasculaire associée au développement de cette pathologie. Les souris n'étant pas capable de développer cette pathologie nous utilisons des souris déficientes pour le récepteur aux LDLs et leurs contrôles respectifs). L'infarctus du myocarde (IM) aigu demeure aujourd'hui une cause majeure de mortalité et morbidité dans le monde. Notre objectif est donc d'étudier dans un modèle d'IM l'implication d'OPA1 lors de sa délétion au niveau endothélial.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 740 animaux au maximum.

Nous appliquons la règle des 3 R. Toutes les procédures chirurgicales seront accompagnées d'une analgésie pré et postopératoire (injection de buprénorphine). L'animal sera suivi au réveil et dans les premières heures suivant l'opération, puis quotidiennement. Une grille de score pour l'évaluation de la douleur sera utilisée avec détermination du point limite.

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal. Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de Student et des tests d'Anova deux voies Avec post-test de Bonferroni. Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets. Grâce à ces études nous déterminerons ainsi la place potentielle d'une modulation d'OPA1 au niveau endothélial afin de corriger la dysfonction artérielle et les perturbations des débits sanguins locaux.

**9541** La fibrose est une lésion élémentaire du tissu conjonctif définie par l'augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extracellulaire. Le processus fibrotique fait partie de la physiopathologie dans un certain nombre de myopathies, en particulier les dystrophies musculaires.

La fibrose musculaire est un aspect particulièrement important dans la mesure où elle conditionne largement les capacités contractiles des muscles. Parmi les différentes variables pathologiques, tels que le diamètre des myofibres et la quantité de fibres en dégénérescence, le degré de fibrose endomysiale est la seule variable qui ait montré une corrélation significative avec un mauvais pronostic moteur (pronostic basé sur l'âge de perte de l'ambulation et des tests de force musculaire). De plus, la substitution du muscle par du tissu fibrotique a un impact négatif sur l'efficacité des thérapeutiques.

A ce jour, le diagnostic positif de fibrose musculaire est fait à partir de l'analyse histologique de biopsies musculaires. Le développement d'outils pour l'évaluation non-invasive et atraumatique de la fibrose musculaire est d'une importance majeure pour le suivi des patients, mais aussi pour le développement pré-clinique de nouveaux traitements anti-fibrotiques plus spécifiques et efficaces.

Ce projet a pour but de caractériser par imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) la fibrose interstitielle dans le muscle squelettique en minimisant des facteurs de confusion comme l'inflammation. Ces outils permettront des études longitudinales de l'évolution spontanée de la fibrose musculaire, mais aussi celles des effets de possibles thérapies pour contrôler la progression des dystrophies en général ou pour l'évaluation des thérapies spécifiquement anti-fibrotiques.

Dans ce contexte, la RMN et l'Ultrasonographie (US) sont des outils d'intérêt, permettant l'évaluation anatomique et fonctionnelle des muscles sans l'utilisation de radiations ionisantes. La RMN plus particulièrement permet en plus l'évaluation métabolique des muscles.

Néanmoins, dans le muscle dystrophique d'autres processus pathologiques (inflammation, nécrose, infiltration graisseuse) interviennent en parallèle de la fibrose. Ces différents processus peuvent se superposer ou contrebalancer l'effet de la fibrose sur les variables mesurées par RMN ou US.

Ainsi, ce projet vise essentiellement deux objectifs : (i) le développement d'un modèle de fibrose musculaire, chez la souris où l'inflammation, la nécrose et l'infiltration graisseuse sont minimisés, et (ii) le développement des outils de RMN et US pour une évaluation atraumatique de la fibrose musculaire *in vivo*.

La fonction musculaire est dépendante du fonctionnement des cellules musculaires, mais aussi d'une combinaison des fonctions vasculaire et nerveuse de l'individu. Il n'existe à ce jour aucun protocole *in vitro* permettant d'atteindre ce niveau de différenciation et d'organisation, ce qui rend les études *in vivo* indispensables pour les études sur la structure et le fonctionnement du muscle normal et du muscle fibrotique. Pour disposer d'un modèle de souris cliniquement pertinent, avec des niveaux de fibrose musculaire similaires à ceux observés dans les stades initiaux des dystrophies, deux souches de souris normales, avec deux fonds génétiques distincts seront soumises à deux cycles de dégénération/ régénération pour simuler le processus dystrophique musculaire. Les cycles de dégénération/ régénération musculaire induisent dans un premier temps une inflammation, associée à la nécrose du tissu musculaire qui sera ensuite remplacé en partie par de la fibrose.

Notre hypothèse de travail est que ce modèle murin présentera essentiellement une fibrose endomysiale, avec peu de nécrose résiduelle, d'inflammation et d'infiltration graisseuse, ce qui nous permettrait d'évaluer la sensibilité des outils RMN à la fibrose.

L'application des méthodes de RMN dans l'évaluation du muscle squelettique est déjà une réalité dans le suivi clinique des patients. Néanmoins, l'appréciation spécifique de la fibrose musculaire par RMN ou d'autres méthodes atraumatiques reste problématique. Le développement de méthodes RMN pour l'évaluation de la fibrose est une des priorités du laboratoire depuis plus de 6 ans.

Dans la suite de ce projet, le développement des méthodes RMN et US pour l'évaluation de la fibrose devrait pouvoir être appliqué au contexte plus complexe des maladies neuromusculaires, où la fibrose musculaire est toujours accompagnée par d'autres facteurs qui ont eux-mêmes un impact important dans les variables de RMN et US. Un total de 180 souris avec deux fonds génétiques différents connus pour influencer la cicatrisation et donc le développement de la fibrose.

En pratique, le projet proposé ici est en accord avec la règle des 3R conformément à la directive européenne 2010/63/EU et à sa transposition dans la loi Française. Le recours à des modèles animaux reste indispensable pour ce projet. Le nombre d'individus a été réduit au minimum selon les tests statistiques appliqués. Le raffinement des méthodes d'investigations est pris en compte dans le choix de méthodes d'évaluation non-invasives, échographie et RMN, en particulier. Par nature ces méthodes sont atraumatiques et classées à « degré de gravité léger », rendant possible la réalisation d'études longitudinales, avec évaluation répétée des mêmes animaux.

**9542** Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington et les ataxies spinocérébelleuses (SCA) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

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

les cellules grâce à un vecteur viral. La preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour ces maladies neurodégénératives a déjà été montrée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur AAV, dans le but de choisir le sérotype viral ainsi que la voie et le lieu d'administration les plus appropriés pour cibler la région d'intérêt.

Différentes espèces seront utilisées :

- Tout d'abord, des rongeurs pour valider la faisabilité technique des différentes stratégies dans une espèce de petite taille. Cette preuve de concept est cruciale pour valider la technique de transfert de gènes, validations des différents lots produits et pour la mise en place de différentes techniques expérimentales permettant d'évaluer la bonne intégration du gène d'intérêt dans les cellules cibles et son aptitude à provoquer la production en quantité physiologique de la protéine thérapeutique.

- Une espèce de taille moyenne (primate non humain ; PNH) est fondamentale pour approcher les obstacles de l'administration de volumes importants de vecteur et du ciblage d'organes de taille semblables à celles de l'homme. Pour cela le PNH sera utilisée uniquement lorsque la preuve de concept aura été obtenue chez le rongeur. Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du SNC et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

3R : Comme précédemment décrit, il nous est impossible de remplacer l'animal par une simulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales car le cerveau du PNH est un organe plus complexe par rapport aux rongeurs et plus proche du cerveau humain (taille et anatomie). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum (229 animaux : 204 souris et 25 PNH), et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien être des animaux.

La réalisation d'études pilotes avec l'utilisation d'un gène rapporteur sur quelques PNH permettra de d'estimer la biodistribution du produit thérapeutique dans le cerveau et aussi définir le nombre minimum d'animaux à utiliser sur l'ensemble de l'étude.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et un neurochirurgien. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie in vivo (IRM), pour repérer les sites d'injection avant la chirurgie et pour vérifier si le produit thérapeutique est bien toléré, renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

**9543** Les anticorps également appelés immunoglobulines sont un des composants clés du système immunitaire. Ils jouent un rôle primordial dans la protection contre les agents infectieux, mais peuvent également dans certaines conditions inflammatoires cibler des antigènes du soi et déclencher des maladies auto-immunes. Les anticorps naturels ont également un rôle thérapeutique lorsqu'ils sont utilisés sous la forme d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV). Les IgIV sont un pool d'immunoglobulines G de plasma de milliers de donneurs sains et sont largement utilisées dans le traitement contre les maladies auto-immunes et inflammatoires telles que la maladie de kawaski, le purpura thrombopénique idiopathique, le syndrome de Guillain barré, la démyélinisation inflammatoire chronique ...etc...

Les IgIV représentent une thérapie sûre avec des effets secondaires minimes. En dépit de son utilisation ces 30 dernières années, les mécanismes d'actions des IgIV dans les maladies auto-immunes ne sont pas complètement élucidés. Les preuves actuelles apportées par les modèles expérimentaux et par les patients traités avec les IgIV suggèrent que les IgIV exercent leurs effets



thérapeutiques en ciblant les compartiments de l'immunité innée et adaptative, en inhibant leur activation et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

Le but de ce projet est d'explorer comment les IgIV jouent un rôle protecteur dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), modèle expérimental de la sclérose en plaque. La sclérose en plaque est la maladie inflammatoire chronique du système nerveux central la plus fréquente. Bien que de nouvelles molécules soient disponibles pour le traitement de cette pathologie, leur possibles effets secondaires durant la grossesse et la lactation justifie l'utilisation de thérapie plus sûre telle que les IgIV. Les expériences avec des animaux sont le seul moyen d'étudier l'effet protecteur des IgIV dans l'EAE car l'interaction complexe de la molécule thérapeutique avec le système nerveux central d'une part et les cellules immunitaires d'autre part ne peut pas être modélisée in vitro. L'EAE chez la souris représente un modèle classique bien établi pour l'étude de la sclérose en plaques.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 264 souris C57Bl/6. Nous avons strictement suivi le principe des 3R durant la conception de ce protocole. Ceci correspond au nombre minimal d'animaux qui nous permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les procédures expérimentales ont déjà été établies pour utiliser les concentrations optimales d'IgIV. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de tunnels en cartons). En l'absence de traitement, les signes cliniques de l'EAE apparaissent à partir du 7eme jour après l'induction de la maladie. Les souris seront donc quotidiennement observées pour vérifier les changements de comportement et les signes cliniques de l'EAE classés selon une échelle comportementale prédéfinie. Dès l'apparition des premiers symptômes, des dispositions seront prises afin que les animaux puissent s'alimenter et s'hydrater sans fournir d'effort physique (ajout de nourriture en gel dans les cages). Aucune médication supplémentaire ne peut être ajoutée, du fait du risque d'interférence dans l'étude car les antalgiques disponibles ont tous des effets sur l'inflammation. De ce fait, nous avons établi des points limites adaptés à ce modèle afin de limiter au maximum la souffrance des animaux.

**9544** La cryoconservation permet de préserver des lignées murines sous forme de spermes (ou d'embryons) et assure ainsi leur pérennité au bénéfice de la communauté scientifique. Ceci permet la protection des lignées en cas de force majeure (incendie, inondation) et réduit le nombre d'animaux produits en animalerie grâce à la conservation de lignées non utilisées dans l'immédiat (évite le maintien de lignées sous forme respirante). Elle permet également d'éviter le stress lié au transport d'animaux vigiles lors d'échange entre équipes scientifiques.

Quant à la redérivation, elle permet d'obtenir des animaux au statut SOPF (exempt d'organismes pathogènes spécifiques et opportunistes) à partir de lignées contaminées en utilisant la réimplantation d'embryons sur des mères porteuses saines. Ces embryons peuvent être issus de fécondation in vitro entre des ovocytes et du sperme congelé dans notre cas ou à partir d'embryons frais prélevés sur des mères donneuses super ovulées.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un service au sein de notre animalerie regroupant ces deux méthodes, indissociables l'une de l'autre puisque la redérivation est souvent la suite logique de la cryopréservation.

A ce jour, le service de cryopréservation sous forme de paillettes de spermes est opérationnel. Mais il nous faut mettre en place le service de redérivation. Pour cela, nous réaliserons :

- l'hébergement et l'accouplement de males vasectomisés (procédure 1) avec des femelles SOPF super ovulées (procédure 3) pour obtenir des femelles pseudo-gestantes receveuses des embryons
- L'hébergement et l'accouplement de males d'intérêt (procédure 2) avec des femelles super ovulées (procédure 3) pour obtenir des femelles donneuses d'embryons frais
- la réimplantation d'embryons provenant soit de femelles donneuses soit de fécondation in vitro dans des femelles receveuses SOPF pseudo gestante par chirurgie (procédure 4).

Ces méthodes de cryopréservation et de redérivation répondent aux exigences des 3 R car l'objectif même est de réduire le nombre d'animaux non utilisés au sein des animaleries. De plus, ce projet correspond à une première phase de mise en place de ce service et les animaux seront utilisés dans le cadre de l'acquisition des gestes techniques spécifique (notamment la chirurgie permettant la

réimplantation des embryons) par du personnel expérimenté afin de proposer par la suite un service opérationnel et d'excellente qualité. En plus de l'acquisition de gestes techniques, des FIV seront réalisées dans le cadre des vérifications de nos cryopréservations de spermatozoïdes (réalisation de QC1 après congélation/décongélation de sperme cryoconservé)

Le nombre de souris utilisées a été calculé au plus juste pour satisfaire ces exigences et pourra être réduit si l'acquisition technique est faite rapidement avec le niveau de qualité exigée. L'utilisation de la technique de fécondation in vitro permet de limiter le nombre d'animaux. Ainsi l'euthanasie de 2 mâles permet de récupérer une grande quantité de sperme et l'euthanasie de 9 femelles super ovulées permet de récupérer le nombre d'ovocytes nécessaires sans avoir recours à un grand nombre d'accouplements naturels puis d'euthanasie des femelles gestantes. Nous répondrons aux exigences de raffinement en utilisant une procédure d'analgésie adaptée lors des actes chirurgicaux et réaliseront en parallèle le test d'une nouvelle technique de réimplantation par voie basse (par spéculum) ne nécessitant pas de chirurgie. De plus, tous les animaux seront suivis à l'aide de grilles de score.

Le projet nécessite 740 animaux au maximum.

**9545** Les artères distribuent le sang dans tous les tissus. Elles sont entourées de graisses et ce tissu adipeux périvasculaire n'est pas qu'un tissu de support mais un composant important dans la fonction vasculaire avec, très probablement un rôle important dans les maladies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'athérosclérose. Ce tissu adipeux produit des substances actives qui modifient le fonctionnement des artères et il existe des différences dans la distribution ces graisses entre hommes et femmes. Ceci est dû à des différences de niveau d'expression des récepteurs œstrogéniques qui régulent l'activité des mitochondries qui produisent l'énergie de la cellule mais aussi le stress oxydatif impliqué dans les maladies cardiovasculaires. L'objectif du projet est d'étudier le rôle du stress oxydatif mitochondrial dans l'effet vasoactif du tissu adipeux périvasculaire au niveau de l'aorte chez des souris traitées en chronique avec de la MitoQuinone (MitoQ, bloqueur du stress oxydatif issu de la mitochondrie) comparées à des souris traitées avec un bloqueur du stress oxydatif de référence (apocynine) et des souris contrôles traitées uniquement avec le solvant (eau). Les souris seront déficientes en récepteurs œstrogéniques (ERalpha) ou non (contrôles), mâles et femelles.

18 groupes de 5 ou 10 souris (fond génétique C57Bl6N ou J) âgées de 2 mois seront traités pendant 1 mois soit un total de 150 souris.

Autant de souris mâles que de souris femelles seront utilisées afin de limiter le nombre d'animaux euthanasiés sans être utilisés.

Ce nombre est réduit au minimum et choisi de manière à obtenir des données exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer une réduction des animaux utilisés, en effet le nombre d'animaux utilisé est réduit à son minimum dans chaque groupe. Le raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie ainsi que la surveillance quotidienne des souris. Le remplacement, notre projet a comme objectif d'étudier le rôle des gènes des récepteurs aux œstrogènes dans les maladies vasculaires pour cela les souris transgéniques sont indispensables. Pour finir, le test statistique sera pour comparaisons de plus de 2 échantillons indépendants ( $N < 30$ ) : test non paramétrique de Kruskal-Wallis (One-way ANOVA).

**9546** En raison de l'essor des nanotechnologies, une utilisation croissante de nanomatériaux dans des procédés industriels est observée. Cependant, les connaissances de leur toxicité, notamment leur capacité à induire des cancers, sont insuffisantes pour statuer sur le risque pour la santé des salariés exposés à ces substances. L'inhalation est la voie majeure d'exposition des salariés aux nanomatériaux et leur dépôt au niveau pulmonaire peut être à l'origine de pathologies. Ainsi l'évaluation du danger que représente de telles substances nécessite des études toxicologiques par inhalation chez le rat de laboratoire. L'utilisation de rats génétiquement modifiés représente un modèle alternatif au modèle expérimental de référence pour l'évaluation du potentiel cancérigène d'une substance. L'exposition de rats par inhalation permet un dépôt des particules dans l'ensemble de l'appareil respiratoire constituant ainsi un modèle de choix pour l'extrapolation des résultats à l'homme. Le développement de cancer est un processus long, par conséquent les animaux seront

exposés par inhalation oro-nasale pendant 13 semaines puis suivis pendant 6 mois. Les points limites associés à ce type d'étude comprennent une perte de 20% du poids corporel, l'apparition d'une détresse respiratoire, de signes de souffrance (prostration, piloérection) et de lésions cutanées. Une attention particulière sera portée sur l'apparition de tumeurs avec l'euthanasie des animaux dès leur détection. Cependant des points limites spécifiques s'appliqueront si nécessaire : une masse tumorale visible de 25 mm, des tumeurs internes palpables ou qui interfèrent avec la capacité de l'animal à se nourrir, s'hydrater et se déplacer ou qui induisent des vocalisations anormales, une distension abdominale supérieure à 20% par rapport au groupe témoin. Lors de la rédaction de ce projet, le respect de la règle des 3R a été pris en compte. Le principe de Remplacement est difficilement applicable au vue de la complexité des mécanismes physiologiques considérés dans le développement de tumeur. Le principe de Réduction est appliqué au travers de la sensibilité du modèle pour le développement de tumeur et qui requière l'usage d'un nombre réduit d'animaux par rapport au test conventionnel. Le principe de Raffinement est mis en œuvre en limitant au maximum le stress des animaux à la contention en les habituant préalablement à cette contrainte. Un total de 467 rats génétiquement modifiés et 354 rats «génétiquement normaux » Sprague Dawley femelles de 12 semaines sera nécessaire à l'ensemble du projet.

**9547** Les dégénérescences rétiniennes affectent un nombre croissant de personnes dans une population mondiale vivant de plus en plus âgées. Trouver des traitements efficaces pour contrer l'évolution de la maladie menant à la cécité est un enjeu crucial de santé publique.

Dans ce projet, nous allons tester le pouvoir thérapeutiques de 3 molécules sur 2 modèles murins de dégénérescence rétinienne induite que nous avons mis au point au laboratoire.

Dans le premier modèle la dégénérescence rétinienne est induite par administration d'un inhibiteur du transporteur de la taurine. C'est la diminution de la concentration plasmatique en taurine qui induit la dégénérescence rétinienne dans ce modèle (diminution de l'épaisseur de la rétine, électrorétinogrammes anormaux). Nous utiliserons des souris albinos pour ce modèle.

Dans le second modèle la dégénérescence rétinienne est induite par inhibition du système S (confidentiel). Nous utiliserons des souris « normales » pour ce modèle.

L'efficacité des molécules thérapeutiques sera évaluée par analyse de la structure de la rétine par imagerie in vivo (micron III, OCT, SLO) et de la fonction rétinienne par des électrorétinogrammes.

Au total 350 animaux seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'activité rétinienne ne peut être mesurée par des tests in vitro.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse) pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les études préalables in vitro ont déjà été effectuées.

**9548** Le contrôle de la communication entre les neurones est nécessaire pour adapter les réponses des neurones aux modifications de l'environnement. La communication neuronale se fait au niveau des synapses, qui sont des structures spécialisées où un neurone contacte un autre neurone dit post-synaptique pour induire une réponse. Certaines synapses permettent l'activation des neurones et sont dites excitatrices, d'autres préviennent cette activation et sont dites inhibitrices. Ces dernières années, nous avons montré que des macrophages présents dans le cerveau, les microglies, participent de manière importante à la régulation des synapses excitatrices et inhibitrices.

Nos études visent à mieux caractériser les régulations des synapses inhibitrices par la microglie et aussi à en comprendre les répercussions physiologiques. En particuliers, il est connu que les synapses inhibitrices sont importantes pour la physiologie du sommeil. Nous examinerons si les régulations des synapses inhibitrices par les microglies que nous avons mises en évidence sont

impliquées dans la régulation du sommeil. Dans les lignées cellulaires, les interactions entre neurones et microglies ne sont pas conservées et nous devons utiliser des systèmes plus intégrés. Ainsi, les études sur le sommeil devront se faire sur des animaux.

La règle des 3R sera suivie de la manière suivante : Réduction - Les enregistrements du sommeil seront réalisés en séquentiel ce qui permet de réduire considérablement le nombre de souris utilisées puisqu'une seule souris permet de réaliser plusieurs conditions expérimentales. Raffinement - Nous réduirons au maximum l'inconfort des souris car les procédures que nous mettrons en œuvre sont bien établies et n'induisent pas de douleur d'angoisse ou de stress, et nous appliquerons des soins pré- et post-opératoires quand cela sera utile. Remplacement - Il n'existe pas de méthode alternative fiable pour étudier le sommeil : il ne peut s'étudier que sur des animaux entiers. Nous serons néanmoins vigilants quant au développement de méthodes alternatives pendant la durée de ce projet. Nous prévoyons d'utiliser environ 30 souris pour ce projet.

**9549** Malgré la reconnaissance des effets positifs de l'exercice physique sur la santé, la sédentarisation de la population est croissante, et ce, pour des raisons socioculturelles mais également biologiques (e.g. faible motivation pour l'exercice). Cette sédentarisation a des effets sanitaires mais également financiers désastreux pour la santé publique. Malheureusement, les bases neurobiologiques de cette absence de motivation pour l'activité physique sont encore inconnues. Des travaux précédents suggèrent que le système endocannabinoïde pourrait jouer un rôle dans cette absence de motivation pour l'activité physique. De plus, les conséquences pathologiques de cette sédentarisation s'expriment dans de nombreuses maladies. Parmi celles-ci, les troubles du comportement alimentaire tels que l'obésité, dans laquelle la motivation pour la prise alimentaire l'emporte sur la motivation pour l'activité physique. A l'inverse, l'anorexie nerveuse restrictive résulte d'un déséquilibre motivationnel en faveur de l'activité physique aux dépens de la prise alimentaire. L'exemple de l'obésité indique la nécessité de ne pas étudier la motivation pour l'activité physique individuellement mais en comparaison avec la motivation pour une autre récompense, telle que la prise alimentaire. Enfin, de nombreuses études mettent en avant le rôle primordial des traumatismes subis au cours de l'enfance et/ou de l'adolescence dans l'étiologie de maladies psychiatriques et particulièrement pour l'anorexie nerveuse restrictive, une pathologie touchant essentiellement les adolescentes et qui se manifeste par une motivation accrue pour l'activité physique aux dépens de la motivation (vitale) pour la prise alimentaire.

Ce projet vise alors à analyser l'hypothèse de l'implication du système endocannabinoïde à l'aide du modèle souris en incluant des souris standard C57Bl/6N et CD1 ainsi que des souris mutantes (et sauvages : wild-type) pour le principal récepteur cérébral des cannabinoïdes, le récepteur CB1. Ces souris seront soumises à un apprentissage au cours duquel elles apprendront à effectuer un travail (introduction du museau dans un orifice un nombre de fois prédéfini) pour avoir accès à une roue d'exercice. Par définition, cette étape du projet n'inclura aucune souffrance puisque les animaux seront confrontés à une récompense au cours d'une seule session par jour d'une durée maximale d'une heure.

Ce projet souhaite également examiner, à l'aide de souris mutantes pour le récepteur CB1, si le système endocannabinoïde contrôle la motivation pour la prise alimentaire, et si oui, répondre à la question de la spécificité de ces mécanismes pour la prise alimentaire ou l'activité physique. A nouveau, les souris seront soumises à un apprentissage au cours duquel elles apprendront à effectuer un travail (introduction du museau dans un orifice un nombre de fois prédéfini) pour avoir accès à des granules chocolatés. Par définition, cette étape du projet n'inclura aucune souffrance puisque les animaux seront confrontés à une récompense au cours de deux sessions consécutives de 30 minutes chaque jour.

Dans un dernier volet, notre projet vise à étudier les conséquences d'un stress d'isolement social post-sevrage (hébergement individuel), en tant que traumatisme dans l'enfance, sur les motivations respectives pour l'activité physique et la prise alimentaire chez des souris mâles et femelles. Cette étape, réalisée initialement avec des souris "standard" C57Bl/6N, sera étendue à différents mutants conditionnels du récepteur CB1. Les souris suivront un protocole d'apprentissage identique à celui mentionné précédemment. La seule souffrance résidera dans un hébergement individuel

immédiatement après le sevrage pour une moitié des animaux, un paradigme pour lequel le demandeur a déjà obtenu une autorisation.

Par définition, ce projet ne peut être conduit sur des cultures de cellules ou de tissus rendant ainsi le remplacement de l'animal de laboratoire impossible. L'espèce animale choisie est la souris, qui permet de mesurer l'impact de mutations génétiques de protéines d'intérêt (ici, le récepteur CB1). Ayant conscience de la nécessité de réduire au maximum le nombre d'animaux expérimentés tout en conservant une significativité scientifique d'un point de vue statistique (hétérogénéité inter-individuelle), le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux variera entre 10 et 12, soit 1488 souris au maximum. Afin de raffiner les conditions d'utilisation des animaux inclus dans l'étude, les cages d'hébergement seront enrichies de matériel de nidification, et le bien être de l'animal sera suivi quotidiennement au cours de l'étude.

**9550** La cystite interstitielle (CI), aussi appelée syndrome de la vessie douloureuse, est une affection urologique très invalidante. Maladie chronique inflammatoire mais non infectieuse, la CI touche principalement les femmes. Elle provoque d'intenses douleurs dans le bas ventre ainsi que des mictions fréquentes et urgentes de jour comme de nuit. Aujourd'hui, les causes précises et la physiopathologie de la CI ne sont pas connues, cette affection est considérée encore comme multifactorielle. Les traitements sont empiriques et non universels avec pour but de diminuer l'intensité des symptômes et leur impact sur la qualité de vie des patients.

Le cyclophosphamide (CYP) (Endoxan®) est une molécule utilisée dans certains protocoles de chimiothérapie et dans les affections auto-immunes. Selon les études, entre 2 et 40% des patients traités avec le CYP développent une CI. Cette dernière est provoquée par l'un des métabolites secondaires du CYP ; l'acroléine qui s'accumule dans la vessie avant d'être éliminée. C'est pendant cette période de stockage que le contact de l'acroléine avec la paroi vésicale induit progressivement le développement d'une inflammation. Cette toxicité vésicale se manifeste essentiellement par des hématuries et des brûlures mictionnelles plus ou moins importantes, associées à des douleurs abdominales et une inflammation de la vessie.

Expérimentalement, deux modèles de cystite induits par injection intrapéritonéale de CYP sont aujourd'hui utilisés chez le rongeur :

- Modèle aigu (jusqu'à 48 heures de temps)
- Modèle chronique (jusqu'à 3 semaines).

Ils sont caractérisés par une augmentation du nombre de mictions, une inflammation de la vessie et une douleur viscérale. De ce fait, ces modèles CYP regroupent les 3 symptômes caractéristiques de la CI et sont considérés comme modèles de référence afin de tester des candidats médicaments pour le traitement de la CI.

L'objectif de cette étude sera d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans des modèles de CI aiguë ou chronique induits par le CYP chez le rat femelle (évaluation nociceptive et / ou de la fonction vésicale).

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive ou de la fonction vésicale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement de la CI.

Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux (rats) utilisés sera de 8280 dont 3600 pour une évaluation nociceptive et 4680 pour une évaluation fonctionnelle de la vessie. Nous avons établi une stratégie d'expérimentation qui nous permet de mesurer la valeur basale de chaque animal. Ainsi, chaque animal est son propre contrôle. De plus, les analyses de l'hypersensibilité viscérale (test manuel de von Frey) et du profil mictionnel (cage à métabolisme) sont deux techniques non-invasives. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps la réponse nociceptive ou mictionnelle d'un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

En accord avec la règle de raffinement, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale gazeuse avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffant. Le réveil des animaux sera surveillé attentivement et l'état général des animaux contrôlé quotidiennement.

De plus, les animaux seront hébergés selon les recommandations de la directive européenne avec un enrichissement de leur hébergement (morceau de bois ou tunnel) permettant de les stimuler. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

Ce projet incluant des procédures classées sévères subira une évaluation rétrospective par les autorités compétentes.

**9551** La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie très fréquente qui touche les lymphocytes B, des acteurs majeurs du système immunitaire. Cette maladie lymphoproliférative est caractérisée par des altérations du trafic et de la rétention tissulaire des lymphocytes, ce qui suggère un rôle critique du microenvironnement. A ce jour, de nouvelles thérapies ont montré une remarquable efficacité à vider les stocks ganglionnaires de cellules tumorales. Cependant, l'arrêt de traitement conduit inmanquablement à la rechute de la maladie voire à des résistances induites par la thérapie. Il est donc important de mieux comprendre et caractériser les mécanismes qui conduisent au trafic altéré des lymphocytes tumoraux afin d'identifier des cibles thérapeutiques alternatives. Pour cela, nous envisageons de mener une analyse comparative de la migration et de la dynamique dans les organes lymphoïdes de cellules B issues de patients atteints de LLC et de témoins sains après transplantation dans des souris. Ce projet se déroulera sur 2 ans et il nécessitera environ 48 souris. L'approche de cette étude repose sur la capacité des cellules humaines leucémiques à migrer dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes murins. Cela permet d'étudier les mécanismes de mobilité et adhésion d'une population proliférative dans des conditions plus proches de celles retrouvées chez les patients. A ce jour, la souris reste le modèle de premier choix pour la modélisation in vivo des interactions entre les cellules leucémiques et les cellules stromales du microenvironnement. Cependant toutes les mesures nécessaires seront prises pour suivre la réglementation des 3R, en accord avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement très fortement encouragées dans la nouvelle directive européenne. Afin de respecter le principe de raffinement, le personnel formé travaillant avec les animaux possède des diplômes en Expérimentation animale de niveau I ou II. Egalement les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute souffrance que pourrait ressentir les animaux. Pour réduire le nombre des animaux utilisés, nous avons estimé un nombre minimum de souris pour l'obtention de résultats tout en conservant la significativité statistique. En accord avec le remplacement, nous utiliserons autant que possible des approches in vitro pour la mise au point des protocoles

**9552** La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 1% de la population âgée de plus de 60 ans et 4% de la population des personnes de plus de 80 ans. C'est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui progressivement entraîne des troubles moteurs (tremblements, rigidité musculaire, impossibilité ou ralentissement des mouvements). Comme d'autres maladies neurodégénératives, il n'y a pas de traitement capable de stopper ou guérir la maladie. Les traitements qui existent sont purement symptomatiques. La L-DOPA (Levodopa) est le traitement le plus utilisé. Elle compense la diminution ou l'absence du neurotransmetteur dopaminergique liée à la neurodégénérescence. Toutefois, le traitement à la L-DOPA entraîne des effets secondaires sérieux tels que la dyskinésie (mouvements anormaux involontaires), la désorientation et la confusion, etc... Plusieurs voies de recherche sont en cours pour le traitement de la maladie de Parkinson et incluent par exemple la thérapie génique, la greffe de neurones et les médicaments neuroprotecteurs. Un des modèles animaux (rat) le plus utilisé dans la recherche sur la maladie de Parkinson est basé sur une lésion unilatérale et sélective par injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Cette injection affecte chez le rat la même zone cérébrale que les patients atteints de la maladie de Parkinson et permet de mimer certains de leurs symptômes. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), les injections de 6-OHDA sont effectuées sous anesthésie gazeuse, les animaux reçoivent une injection d'antalgique 30min

avant l'anesthésie ainsi que le soir et le lendemain de l'injection afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleurs possibles.

De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 600 rats est envisagée.

**9553** La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation ou d'une lésion nerveuse, la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Récemment, notre connaissance de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes. L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques.

Comment le toucher devient-il douleur ? Normalement, ces sensations sont indépendantes. Les nerfs véhiculant les messages douloureux se terminent dans les couches superficielles de la corne dorsale, et ceux véhiculant les messages tactiles dans les couches profondes. Cependant, suite à une lésion nerveuse ou une inflammation périphérique, les informations tactiles peuvent accéder aux neurones de la douleur des couches superficielles via un 'court-circuit' et provoquer ainsi une allodynie mécanique. Les mécanismes et les fibres sensorielles responsables de cette sensibilisation centrale sont peu connus. Il a été suggéré que les fibres non-peptidergiques C sensibles à l'isolectine B4 (fibres IB4) participent activement à l'expression de l'allodynie mécanique mais leur rôle dans les douleurs céphaliques et extracéphaliques est mal connu. Dans ce projet qui s'étendra sur une durée de cinq ans, nous étudierons l'effet de l'ablation sélective des fibres IB4 par un composé appelé IB4-saporine sur l'expression de l'allodynie mécanique céphalique et extracéphalique d'origine inflammatoire. Nous étudierons également l'effet de cette ablation sur le réseau neuronal et glial de la corne dorsale activé dans ces conditions.

L'ablation des fibres IB4 sera induite par une injection intranerveuse d'IB4-saporine chez le rat. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale. 3 semaines après l'injection, la sensibilité cutanée de l'animal (pression nécessaire entraînant un comportement d'évitement) sera évaluée à l'aide de filaments de calibres croissant appliqués au niveau de la peau. Une fois ce test réalisé, ces animaux recevront une injection sous-cutanée de formaline ou d'adjuvant complet de Freund (CFA) afin d'induire une douleur inflammatoire. Dans un premier groupe d'animaux, la sensibilité cutanée sera à nouveau évaluée afin d'évaluer l'effet de l'ablation des fibres IB4 sur la douleur d'origine inflammatoire. Un second groupe d'animaux permettra d'évaluer l'activité cellulaire de la corne dorsale par immunohistochimie dans ces conditions. Un troisième groupe d'animaux permettra d'analyser le contenu protéique de la corne dorsale par western blot dans ces conditions. Un quatrième groupe d'animaux permettra d'évaluer l'excitabilité de la corne dorsale par électrophysiologie dans ces conditions. Ces expérimentations seront réalisées soit au niveau de la patte, soit au niveau de la face, afin d'évaluer l'implication des fibres IB4 dans les douleurs céphaliques et extracéphaliques. Les groupes d'animaux décrits ici sont représentés dans le document annexe.

Pour ce projet, l'expérimentation sur des animaux est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation d'animaux dans ce protocole : en effet, l'expression du toucher ou de la douleur fait intervenir de nombreux circuits neuronaux, pour la plupart largement méconnus, qui ne peuvent être reproduits artificiellement. Afin de respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux par groupe est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés en fonction de la technique

utilisée. Au total 372 rats mâles, de 200 à 500g, seront utilisés dans ce projet (descriptif des groupes indiqué en annexe). Lorsque cela sera expérimentalement possible et dans le maintien de la règle des 3R « réduire et raffiner », nous utiliserons les mêmes animaux pour analyser le comportement de l'animal in vivo, puis l'activité de la corne dorsale post-mortem. Pour chaque animal, nous réaliserons une injection intranerveuse unique d'IB4-saporine et la quantité de fibres détruites sera analysée pour chaque animal post-mortem. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal est nécessaire. Les modèles inflammatoires seront induits par l'injection sous-cutanée de formaline ou de CFA. Ces modèles sont couramment utilisés au cours de recherches sur les mécanismes de la douleur d'origine inflammatoire.

Ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'induction de l'ablation des fibres IB4 ou de l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 15% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique.

**9554** Le stress augmente les taux d'hormones glucocorticoïdes (cortisol de l'homme, corticostérone du rat) sanguins. Les hormones glucocorticoïdes agissent sur différents organes via leur fixation sur des récepteurs spécifiques. Si l'augmentation d'hormones glucocorticoïdes en réponse à un stress bénéficie à l'organisme à court terme, elle a des effets délétères dans le cas d'un stress chronique. On connaît les effets négatifs du stress sur l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans la mémoire. Pour mieux comprendre les effets délétères du stress sur le cerveau, nous utilisons l'olfaction comme modèle de fonction nerveuse. Chez le rongeur, le stress influence la perception olfactive. Dans le nez d'un rongeur stressé, la muqueuse olfactive répond moins bien à des stimulations par les odeurs. Notre projet vise à étudier les effets des glucocorticoïdes sur les neurones et les cellules gliales (cellules associées aux neurones) des circuits de l'olfaction. La dexaméthasone, connue et utilisée chez l'homme pour ses effets anti-inflammatoire et immunosuppresseur, est un agoniste (imite en général le messageur qui se lie habituellement avec le récepteur en question) des récepteurs des glucocorticoïdes. Le RU486 est un antagoniste des récepteurs des glucocorticoïdes. Nous mesurerons la réponse de rongeurs à des odeurs avec ou sans traitement par la dexaméthasone et/ou le RU486. Les approches expérimentales que nous utilisons incluent : le comportement de rongeurs exposés à des odeurs, l'enregistrement de l'activité de la muqueuse olfactive et de celle du cortex olfactif quand ils sont exposés aux mêmes odeurs, l'expression de marqueurs d'activation des neurones et des cellules gliales dans les circuits de l'olfaction.

Le projet s'inscrit dans le cadre d'enseignements réalisés pour un master 1 de biologie et santé. Des étudiants participeront aux protocoles décrits. Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou aucune simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du recrutement des réseaux de neurones pendant le stress. Les rongeurs utilisés sont étudiés par un grand nombre de laboratoires dans le monde, par conséquent ils fournissent une base de données comparative importante. D'autre part ils répondent au stress, comme l'homme et les animaux domestiques, par une production accrue d'hormones corticoïdes. Le projet utilise 382 rongeurs nés et élevés dans un élevage agréé. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'emploi de tests statistiques pour analyser les résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies en accord avec le vétérinaire de l'installation pour éviter toute souffrance. Les animaux sont visités quotidiennement par du personnel agréé.

**9555** En France l'arthrose touche plus de 10 millions de patients, avec un impact socio-économique majeur. Malheureusement cette pathologie ne dispose pas d'un arsenal thérapeutique suffisamment efficace. En effet, les différences entre le placebo et de nombreuses thérapies généralement utilisées sont assez modestes.



Le défi majeur actuel concernant l'arthrose est de découvrir et de développer des médicaments capables d'agir sur les phénomènes à l'origine de l'atteinte articulaire, et n'agissant pas seulement sur les symptômes. Un autre objectif important est de comprendre le manque actuel de liens entre l'aspect des lésions vues en imagerie et la gêne fonctionnelle subit par le patient.

L'arthrose est la résultante de phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la fabrication et la dégradation du cartilage. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétique, biochimique ou traumatique. Le chondrocyte est l'unique type cellulaire présent dans le cartilage articulaire. Il est capable de synthétiser mais également de dégrader le cartilage. En cas de contrainte mécanique anormale, les chondrocytes articulaires augmentent la sécrétion de d'agents inflammatoires, et la production d'espèces chimiques oxygénées (ROS).

Le projet a pour but de réguler la quantité de ROS produite dans trois modèles d'arthrose différents et d'évaluer l'effet sur le développement de la maladie. L'objectif secondaire de cette étude est de faire le lien entre l'incapacité articulaire observée des animaux avec des techniques d'imagerie innovantes : l'IRM (imagerie par résonance magnétique), et une nouvelle tomographie à rayon X, actuellement en cours de mise au point.

Remplacer

Nos résultats *in vitro* ont identifié une biomolécule comme la principale source de ROS dans les chondrocytes humains. La modulation de son activité pourrait par conséquent être un outil thérapeutique prometteur dans l'arthrose. Il reste à prouver cette hypothèse *in vivo*. Le choix de la souris s'impose car il existe des souris mutées pour cette biomolécule.

Réduire

Un calcul statistique ainsi que des publications sur ces modèles d'arthrose nous amènent à un effectif de 192 souris. Ces effectifs ne seront pas dupliqués mais les souris transiteront de l'établissement porteur du projet initial vers celui de ce présent projet équipé d'un IRM.

Raffiner

L'évolution de la maladie se fera sur 8 à 12 semaines. Ce délai est suffisamment long pour que des lésions soient observées mais suffisamment court pour que les animaux ne soient pas trop handicapés par le début de la gêne fonctionnelle. Cette gêne sera évaluée chaque semaine et les animaux euthanasiés si elle devient trop importante.

La contrainte maximale est de grade modéré.

**9556** Les ruminants ont un système digestif composé de plusieurs poches gastriques : le réseau, le feuillet, la caillette et le rumen. Dans le rumen, l'animal héberge des micro-organismes, qui participent activement à la dégradation, par hydrolyse et fermentation, des aliments ingérés. Ils ont un rôle essentiel dans la dégradation des fibres notamment. Cette particularité confère aux ruminants un avantage comparé aux animaux monogastriques qui valorisent beaucoup moins efficacement les aliments fibreux. Mais c'est aussi cette microflore qui produit du méthane, important gaz à effet de serre. L'animal et son microbiote ruminal ne sont pas indépendants, de récentes études suggèrent l'existence d'interrelations spécifiques. Une meilleure connaissance de cette symbiose microbiote ruminal / animal permettrait d'identifier de nouveaux leviers d'action pour mettre l'alimentation d'un ruminant en meilleure adéquation avec les capacités fermentaires de son microbiote. L'individualisation du management (notamment alimentaire) des animaux est un des objectifs de l'élevage de précision pour économiser et valoriser au mieux les ressources pour répondre aux attentes de la société. Cette connaissance passe par la compréhension des facteurs de variabilité de la composition microbienne et des processus fermentaires observés entre animaux.

Ce projet a donc pour objectif d'étudier les interrelations entre micro-organismes présents dans le rumen, l'animal hôte et l'alimentation, et leurs effets sur les réponses phénotypiques (dégradation ruminale des composants de ration, production de gaz...). Il intègre l'utilisation de maximum 8 vaches canulées du rumen, dans un modèle expérimental dans lequel chaque animal est son propre témoin, permettant de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour une étude statistiquement valide. L'utilisation d'animaux canulés du rumen est nécessaire car elle permet un accès direct au rumen, pour la réalisation des prélèvements permettant l'étude de la microflore ruminale, sans douleur pour l'animal, quel que soit le nombre de manipulations. Les vaches recevront des rations alimentaires représentatives d'élevages. Elles seront logées dans un bâtiment d'élevage équipé de logettes

individuelles munies de tapis de couchage récemment renouvelés (2018), permettant un confort maximal dans les logettes, pour le couchage notamment, d'une aire d'exercice et d'une brosse. Les animaux seront quotidiennement suivis par un animalier qualifié et formé, afin de détecter le plus rapidement possible les éventuels comportements anormaux (manque d'appétit, boiterie, posture anormale).

Pour étudier les interrelations entre micro-organismes présents dans le rumen et l'animal hôte, une modification de la communauté microbienne ruminale sera réalisée par synchronisation : elle consistera à homogénéiser les contenus ruminiaux des animaux après vidage et mélange de ces derniers et à étudier l'effet de ce changement de microbiote ruminal sur le fonctionnement fermentaire dans ce compartiment digestif. La compréhension de ces interrelations ne peut pas être réalisée uniquement par observations, l'échange de contenus ruminiaux est nécessaire pour comprendre quels sont les principaux facteurs de variations qui expliquent et contrôlent les différences de performances observées entre individus. L'effet de la synchronisation des rumens sur la dégradabilité ruminale des aliments, le pH, les fermentations du rumen, par prélèvement de contenu et le suivi de l'absorption des nutriments par prélèvements sanguins seront étudiés. Les prélèvements de jus de rumen seront soit directement analysés, soit utilisés comme inoculum au sein de dispositifs in vitro pour une étude plus poussée des processus fermentaires. Ces méthodes in vitro ne peuvent cependant pas totalement se substituer aux méthodes in vivo (directement sur les animaux), car elles n'intègrent pas les effets de la rumination, de la salivation, de la taille du rumen et de la capacité d'adaptation des micro-organismes in vivo.

Enfin, ce projet vise également à développer une méthode moins invasive que la canulation ruminale permettant également la caractérisation de la communauté microbienne ruminale. Pour cela, les populations microbiennes d'échantillons de rumen prélevés par la canule ruminale seront comparées aux populations microbiennes d'échantillons de contenus digestifs en cours de rumination prélevés dans la bouche de l'animal.

**9557** Projet : Le but de cette étude est d'établir l'influence du facteur de transcription Slug sur la croissance, l'invasion et la vascularisation de xénogreffes de cancer colorectal humain HT-29.

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, ces 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. Nous suivrons la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'influence de ce facteur.

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 respectés au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés, le remplacement a déjà été mis en place car les études in vitro ont déjà été faites, cependant les études in vivo doivent également être étudiées car dans cette situation, l'environnement de la 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 euthanasiés, 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 48 souris.

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

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 48 souris expérimentales pour une durée maximale de 5ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Les études in-vitro déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans

cette étude. En effet, cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés.

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. De précédentes études déjà effectuées nous permettent de savoir 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 des résultats dans le respect du bien être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

**9558** La destruction des globules rouges, appelée hémolyse, peut survenir précocement et massivement dans un contexte pathologique, tel que dans la drépanocytose ou dans le paludisme. Le contenu de la cellule, notamment l'hémoglobine (Hb), se déverse alors dans la circulation sanguine. L'Hb assure le transport de l'oxygène au sein de l'organisme. Elle contient 4 noyaux d'hème qui, en cas d'hémolyse, se retrouvent libres et peuvent réagir avec d'autres éléments circulants ou certains récepteurs cellulaires, à l'origine de mécanismes pro-inflammatoires et pro-oxydants, potentiellement délétères pour l'organisme.

Les anticorps (Acs), protéines du système immunitaire, sont capables d'interagir avec l'hème. La majorité des Acs sont monoclonaux : ils reconnaissent de manière spécifique un motif appelé antigène (Ag). Le complexe Ac-Ag formé est reconnu par des cellules immunes, permettant la neutralisation des agents pathogènes. Cependant, au contact de l'hème, l'Ac peut devenir poly-réactif et reconnaître un panel d'Ags, potentiellement portés par nos propres cellules. L'acquisition de cette nouvelle poly-spécificité a pu être démontrée dans notre laboratoire à partir d'échantillons de sang de patients atteints de drépanocytose. Elle pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la fonction de certains organes, notamment le rein.

En effet, en situation d'hémolyse, la fonction rénale est particulièrement atteinte, et on peut retrouver des dépôts d'Acs à la surface des glomérules. De ce fait, l'objectif de notre projet est de déterminer à partir de modèles animaux reproduisant un contexte hémolytique si ces dépôts sont bien favorisés par l'hémolyse et s'ils sont à l'origine des lésions provoquant l'insuffisance rénale.

La présence de ces Acs au niveau rénal en contexte hémolytique (provoquée par injection de phénylhydrazine (PHZ) - un agent chimique hémolytique), a déjà été rapportée dans un modèle sauvage C57Bl6. Pour en étudier le rôle, l'utilisation d'un modèle murin RAG-KO, incapable de produire des Acs, permettrait de comparer les paramètres cliniques, biologiques et histologiques objectifs consécutifs à une hémolyse. De plus, ces souris seront reconstituées en Acs, par injection d'Acs poly-réactifs pré-sélectionnés et isolés, pour valider notre hypothèse par comparaison avec les animaux non reconstitués. L'utilisation d'un organisme vivant complet est nécessaire pour évaluer l'impact de la poly-réactivité induite des Acs.

L'hémolyse constitue un facteur commun à un large panel de maladies ; la compréhension des mécanismes mis en jeu ici nous permettrait d'apporter des moyens préventifs et curatifs des lésions organiques secondaires, notamment rénales. L'extension de ce domaine de connaissance pourrait permettre l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les règles de bien être animal et la théorie des 3R seront respectées. Les expériences menées in vitro nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal. Par ailleurs, une attention particulière sera portée au raffinement de l'environnement des animaux. Leur nombre ne dépassera pas les 5 souris par cage, et l'environnement sera complété avec du matériel afin de créer un environnement non stressant pour l'animal. Si l'animal présente des signes de souffrance trop importants dans le cadre

de l'expérimentation, celui-ci sera euthanasié. Enfin, les doses efficaces testées par l'approche *in vitro*, et l'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude de la littérature permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Cependant, afin de valider notre hypothèse et prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 312.

**9559** Le développement et la croissance des organismes vivants sont assurés par la division de leurs cellules, au cours de laquelle l'information génétique est dupliquée puis distribuée de manière égale entre les deux cellules filles lors de la phase-M (ou mitose) du cycle cellulaire.

Les cellules germinales (ovocytes et spermatozoïdes) se divisent selon un mode de division qui leurs est spécifique : la méiose. Cette division consiste en l'enchaînement de deux divisions cellulaires sans duplication de l'information génétique, ce qui assure la formation de gamètes haploïdes ne contenant qu'une moitié de l'information génétique parentale. A la fécondation, la fusion des gamètes mâle et femelle restaure la ploïdie cellulaire requise pour le développement d'un nouvel individu.

Chez la femelle, la différenciation d'un ovocyte en gamète fécondable se fait dans l'ovaire lors de l'ovogénèse. Ce processus débute lors de la vie fœtale avec la prolifération des cellules germinales diploïdes dans les ovaires embryonnaires. Ces cellules débutent alors la méiose et se bloquent en prophase de 1ère division méiotique (prophase I) dans l'ovaire. Durant cet arrêt, l'ovocyte accumule l'ensemble des molécules nécessaires au développement du futur embryon. A la puberté et au moment de l'ovulation, les ovocytes reprennent la méiose sous l'effet d'un signal hormonal stéroïdien et progressent jusqu'en métaphase de 2nde division méiotique (métaphase II). Ils se bloquent alors de nouveau en attendant d'être fécondés. Cette transition de la prophase I à la métaphase II ou « maturation méiotique » correspond à la dernière étape de l'ovogénèse. Le but de ce projet est d'élucider les mécanismes moléculaires qui régulent la maturation méiotique en se focalisant sur ceux qui assurent l'arrêt en prophase I puis le redémarrage du cycle cellulaire au moment de l'ovulation.

Pour cette étude, nous utiliserons l'ovocyte de Xénope qui récapitule les mécanismes moléculaires de contrôle du cycle cellulaire. Il est employé depuis plusieurs dizaines d'années car il présente de nombreux avantages. Cette cellule géante (1,2 mm de diamètre) contient une grande quantité de matériel biologique, ce qui autorise des micromanipulations (microinjections) et l'analyse biochimique de la division cellulaire. Chaque ovaire contient plusieurs milliers de cellules, qui une fois collectées, sont partagées entre les membres de l'équipe ou stockés par congélation. En outre, contrairement aux mammifères, les ovaires se régénèrent sur une période de 6 mois après ovariectomie partielle. Il est ainsi possible d'opérer de 1 à 3 fois les femelles, ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés (146 grenouilles *Xenopus* sur 5 ans) selon la règle des 3R du règlement REACH et le décret N°-2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Concernant le raffinement, les femelles sont maintenues dans un environnement optimal pour leur bien être (eau déchlorée à 20°C, cycle jour/nuit, enrichissement du milieu avec des tubes PVC adaptés à leur taille). L'état général de chaque animal et dans chaque aquarium est surveillé quotidiennement, matin et soir, afin de détecter l'apparition d'un possible amaigrissement, une desquamation, la rugosité et la couleur de la peau. Notre thématique de recherche ne requière pas d'approche statistique mais plusieurs femelles sont nécessaires pour assurer la reproductibilité de nos résultats. De plus ce modèle expérimental ne peut être remplacé par un modèle de culture cellulaire car aucune cellule ne se différencie en cellule germinale *in vitro*. La division cellulaire méiotique étant au cœur de la reproduction sexuée, sa compréhension est essentielle pour appréhender les mécanismes à la base de la fécondation, du développement embryonnaire et de la division cellulaire. Notre recherche peut ainsi avoir des retombées tant dans le domaine de la procréation médicalement assistée que dans celui de la tumorigénèse.

**9560** La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par la mort des neurones dopaminergiques dans la substantia nigra mais aussi par une dégénérescence précoce des neurones de projection noradrénergiques du locus coeruleus (LC), impliqués dans l'attention et la mémoire. Il a été postulé que la diminution de noradrénaline provenant du LC pourrait être une voie physiopathologique commune aux maladies neurodégénératives. Cependant, aucune étude n'a démontré un lien entre des altérations morphologiques subcellulaires et l'apparition de démence.

L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux modèles de MP afin d'améliorer la compréhension des mécanismes liés aux troubles cognitifs ainsi que les mécanismes sous-jacents. Concrètement, nous évaluerons l'effet de la réduction de noradrénaline sur plusieurs marqueurs de dégénérescence ainsi que dans la diminution des capacités cognitives associées à la MP. Pour ce faire, nous utiliserons une procédure qui combine l'administration de la neurotoxine DSP-4 ciblant les neurones noradrénergiques du LC suivie des injections de la neurotoxine MPTP provoquant la mort des neurones dopaminergiques afin de modéliser la MP.

Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un total de 196 souris, nombre que nous estimons comme le minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs sur la base des études publiées à ce jour. Le propos de notre étude ne nous permet pas de remplacer le modèle murin étant donné que nous sommes intéressés par la caractérisation des signes neuropathologiques mais aussi par l'évaluation de la perte de mémoire que l'on peut évaluer chez la souris. Afin d'accomplir le principe de raffinement, tout au long de l'expérimentation, nous veillerons à réduire la souffrance et le stress des animaux en mettant en place plusieurs principes tels que l'acclimatation des souris pendant une semaine dès leur arrivée à l'animalerie, l'hébergement des animaux en groupe avec la présence de nids de coton et l'habituation des souris à l'expérimentateur en manipulant l'animal 1 à 2 fois par jour pendant 5 jours. De plus, le modèle utilisé dans ce projet nécessite une attention particulière car il consiste en l'injection d'une neurotoxine (MPTP) provoquant des effets secondaires indésirables comme l'hypothermie. Pour cette raison, les souris seront hébergées dans des armoires ventilées/chauffées et du gel hydratant sera ajouté au fond de la cage, ainsi que de la nourriture humidifiée. Pour finir, un animalier vérifie le bon état général des animaux le jour de leur réception et quotidiennement pendant l'hébergement, le manipulateur vérifie également le bon état général de l'animal le jour de la manipulation.

**9561** Chez l'homme, la possibilité de contrôler les deux mains de façon indépendante est cruciale pour les activités de la vie quotidienne et implique une latéralisation du contrôle moteur. Le cortex moteur primaire transmet la commande motrice appropriée à la main controlatérale au travers d'un faisceau cortico-spinal croisé. Les mouvements en miroir (MM) sont des mouvements involontaires survenant d'un côté du corps, accompagnant de façon symétrique et simultanée les mouvements volontaires controlatéraux. Les sujets atteints de MM congénitaux sont incapables d'effectuer un mouvement manuel unilatéral strict. Toute activité bi-manuelle élaborée nécessitant une dissociation des mouvements des deux mains est impossible. Il n'y a à ce jour pas de traitement efficace. Les bases moléculaires qui permettent la mise en place d'un contrôle moteur latéralisé au cours du développement sont mal connues.

Notre projet propose de disséquer ces bases moléculaires en nous appuyant sur des modèles de souris transgéniques déficientes pour des gènes impliqués dans le guidage des axones corticospinaux afin i) de caractériser un phénotype « MM » chez la souris par des tests comportementaux, ii) de clarifier les mécanismes développementaux qui aboutissent à l'existence d'un contingent anormal de fibres corticospinales ipsilatérales. Nous effectuerons également des électroporations des gènes mutés chez des souris embryonnaires pour étudier l'effet de ces protéines mutées sur le développement du faisceau corticospinal. La technique d'électroporation permet de ne pas générer de nouvelles lignées de souris et donc de diminuer le nombre de souris.

Plusieurs types de tests seront effectués. Une première série de tests comportementaux sera effectués sur chaque lignée de souris (15 souris transgéniques et 15 souris contrôles) par lignée. Cela nous permettra d'évaluer si la lignée présente ou non des déficits moteurs spécifiques. Puis, nous effectuerons une seconde série de tests plus spécifiques. Certains animaux seront soumis à une chirurgie pour visualiser le faisceau corticospinal et révéler la présence éventuelle d'un contingent de fibres non croisées. Sur certaines de ces souris, nous réaliserons également des tests pour mesurer l'électromyogramme au niveau des pattes après stimulation dans le cortex moteur. Ainsi le nombre d'animaux soumis à une chirurgie sera restreint.

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

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le

raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien euthanasie par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le remplacement, les études in vitro et sur les invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements tel que le contrôle moteur latéralisé. Les rongeurs, en revanche, utilisent leurs pattes avant pour effectuer des mouvements complexes et sont donc des modèles particulièrement bien adaptés. Ce travail permettra de déterminer certaines bases moléculaires du contrôle moteur latéralisé et de définir le rôle du faisceau cortico-spinal dans ce processus.

**9562** Les comportements addictifs sont omniprésents dans la population. Toutefois, face à l'addiction aux jeux, à la cigarette ou aux drogues dites dures, tous les individus ne sont pas égaux. En effet, seulement 30% des usagers deviendront dépendants. Il semblerait que cette dépendance puisse être en partie due à des facteurs génétiques. Plusieurs de ces facteurs ont été identifiés et sont actuellement étudiés par de nombreux laboratoires. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons aux transporteurs vésiculaires de glutamate (VGLUT). Le glutamate est le neurotransmetteur principal du système nerveux central. Il est utilisé comme tel grâce aux VGLUTs qui sont au nombre de 3. Si VGLUT1 et 2 marquent les neurones glutamatergiques définis comme tel, VGLUT3 est particulier car il est présent dans des neurones originellement décrits comme non-glutamatergiques. Nos travaux ont permis de montrer que l'absence de VGLUT3 avait pour conséquence une sensibilisation aux drogues d'abus telle la cocaïne. Nous nous sommes alors intéressés à une population humaine de poly toxicomanes et avons identifié une mutation sur-représentée chez ces individus dépendants. Afin de pouvoir mieux comprendre comment VGLUT3 est impliqué dans la mise en place des phénomènes de dépendance aux drogues, nous avons entrepris d'étudier cette mutation en nous servant d'un modèle murin. Notre projet tend à disséquer le phénotype de ces animaux transgéniques dans différents paradigmes comportementaux afin de mieux comprendre comment une mutation de VGLUT3 augmente la probabilité des individus à devenir dépendant aux drogues. Nous testerons l'effet de cette mutation sur le niveau d'anxiété des animaux, leur sociabilité et leurs réponses aux drogues.

Au total, 536 souris adultes seront utilisées dans ce projet. La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien. Pour la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides. Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injections d'antalgiques ou bien euthanasie par injection d'une surdose d'anesthésique). Concernant le remplacement, les approches in vitro ne permettent pas l'étude de comportements souhaités.

**9563** Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux, des composés inhibant la fonction de protéines potentiellement impliquées dans le cancer du rein ont été sélectionnés. La validation a été réalisée in vitro sur cellules exprimant la cible d'intérêt.

L'étude en modèle animal a pour objectif de valider la cible in vivo dans le cancer du rein et d'évaluer les effets anticancéreux des composés inhibiteurs sélectionnés. Ce cancer au développement insidieux se manifeste très souvent par des métastases difficiles à prendre en charge, en faisant un cancer au pronostic sombre.

Ainsi, des cellules tumorales humaines seront implantées chirurgicalement à des souris immunodéficientes par une approche par injection directe dans le rein comme siège de la pathologie, ceci afin de reproduire au mieux la physiopathologie du cancer rénal. Des études sur le rôle de la cible dans la formation de métastases et sur les effets anti-métastatiques de nos composés seront

réalisées suite à l'injection intra-veineuse de cellules tumorales rénales. L'implantation, la croissance tumorale et les effets anti-tumoraux et anti-métastatiques seront suivis par imagerie de bioluminescence. Le poids des animaux sera évalué 1 fois par semaine.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

- Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et de la littérature dans le domaine du cancer du rein, de son étude in vivo et de l'étude de nouvelles molécules anti-cancéreuses. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur le développement du carcinome rénal ou de ses métastases pulmonaires. Ces procédures ont été élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Le nombre total d'animaux estimé pour ce projet sera de 253 souris.

- Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant été formées à l'expérimentation animale. Les souris font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. L'état clinique des animaux sera contrôlé quotidiennement. La vérification de la douleur aigue sera basée sur le grattage répété au point d'injection et des douleurs chroniques sur immobilité, dos voûté, poils hérissés, diminution du toilettage, auto-mutilation, perte de poids. Points limites : perte de poids >15%, détérioration irréversible de l'état de l'animal impactant sa survie (perte d'alimentation brutale, diarrhée, tremblements, secousses, convulsions, décubitus permanent, difficultés respiratoires, ulcération des cicatrices chirurgicales).

- Remplacer : La souris est le modèle animal le plus couramment utilisé en cancérologie du fait de l'existence de modèles immunodéficients tolérant l'implantation de lignées cellulaires humaines tumorales. De plus, sans évaluation chez l'animal, une molécule à visée anti-cancéreuse ne peut être développé chez l'Homme.

L'euthanasie sera réalisée par dislocation cervicale, avant récupération des organes pour analyses. La mort de l'animal sera confirmée par l'absence de rythme cardiaque, absence de reflexe au pincement de la patte et absence de reflexe cornéen.

Les échantillons collectés seront analysés par pesée, cytométrie en flux, microscopie (fluorescence et immunohistochimie), extraction du matériel génétique des tumeurs, extraction protéique. Les cellules récupérées dans les tumeurs pourront être remises en culture au besoin.

**9564** L'étude du comportement animal est un outil majeur pour la compréhension du fonctionnement du cerveau. En effet, le comportement reflète une prise de décision ou une émotion produite par le cerveau. C'est en premier lieu des traits comportementaux qui vont permettre de diagnostiquer des maladies telles que la dépression, l'addiction, Alzheimer, Parkinson, les troubles autistiques, etc... Il existe aujourd'hui un grand nombre de modèles animaux, notamment chez la souris, permettant d'étudier ces différentes pathologies. Il est impossible de remplacer à l'heure actuelle les modèles animaux pour l'étude de ces pathologies, le comportement étant la mesure essentielle d'évaluation. En accord avec la règle des 3R, concernant la réduction, le nombre d'animaux par groupe sera réduit au strict nécessaire en terme de puissance statistique. Pour le remplacement, ce type d'étude impliquant du comportement ne peut pas être réalisé sur des modèles alternatifs tels que des cultures cellulaires.

Ce projet s'inscrit dans une logique de raffinement de nos protocoles afin d'extraire le plus d'informations possible des animaux utilisés. Ce protocole s'inscrit complètement dans cette logique. En voici la méthode :

Des environnements, plus naturels et enrichis socialement permettent d'étudier à la fois le comportement individuel et social de chaque souris au sein d'un groupe. Ce type d'environnement, plus éthologique permet aux animaux d'exprimer l'ensemble de leur répertoire comportemental. Des outils d'identification par radio-fréquence (RFID) permettent de détecter la position des animaux dans l'environnement mais ne donnent aucune information sur des comportements fins comme les relations sociales entre individu. Nous avons développé un nouveau système qui permet de suivre et de labelliser le comportement de chaque animal au sein d'un groupe pendant plusieurs jours. Ce

système se base à la fois sur une acquisition vidéo 3D avec un apprentissage des identités par machine learning, et par une identification. Il permet en outre d'identifier un certain nombre de comportements exploratoires (marche, arrêt, redressements) mais aussi sociaux (suivis, poursuites...). Nous souhaitons tester ce nouveau système de manière à valider le répertoire comportemental observé, en proposer de nouveaux en réalisant une analyse poussée des trajectoires de chaque individu. Nous souhaitons également créer une cage d'analyse automatisée embarquant ce système ainsi qu'un ensemble d'autres mesures comportementales (prise alimentaire ou de boisson) et électrophysiologiques. Ce système permettra de raffiner grandement la compréhension du comportement de la souris car il permet d'englober l'ensemble des comportements. D'autre part, il limitera le stress des animaux car ceux-ci pourront vivre plusieurs jours dans un environnement large, socialement enrichi, sans qu'aucune intervention extérieure ne soit nécessaire. Au total, nous utiliserons 100 animaux dans ce projet.

**9565** En réponse à un stress, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sécrétées par des cellules spécialisées du tissu médullosurrénalien, les cellules chromaffines, sont parmi les premières hormones à être libérées et ont un rôle majeur dans la réponse adaptative de l'organisme. Si le stress est avant tout un mécanisme de défense naturel contre des agressions physiques ou psychologiques, des états de stress répétés ou prolongés sont des facteurs de risque de pathologies graves telles que l'hypertension, le diabète, la dépression ou encore des pathologies tumorales. Il apparaît donc évident que l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de la libération des catécholamines, tant dans des conditions physiologiques que pathologiques, est nécessaire à une meilleure connaissance des états de stress, et est aujourd'hui un enjeu important dans le domaine de la santé publique et de la recherche médicale. C'est dans ce contexte et plus particulièrement dans celui de l'excitabilité des cellules chromaffines que se positionnent les travaux relatifs à cette saisine. En effet, nous nous intéressons à une famille bien particulière de canaux ioniques, celle des canaux qui régulent finement le potentiel de membrane des cellules et nos travaux ciblent plus particulièrement le canal NALCN (sodium leak channel). Les expérimentations décrites dans cette saisine visent à manipuler génétiquement l'expression de ce canal dans les cellules chromaffines du tissu médullosurrénalien de souris. A partir de 2 lignées de souris, nous injecterons in vivo, directement dans la glande surrénale gauche des constructions virales permettant d'éteindre l'expression du gène NALCN spécifiquement dans les cellules chromaffines. Après transduction du virus, les glandes surrénales seront prélevées et analysées en i) transcriptomique par qPCR, ii) en électrophysiologie (caractérisation de l'excitabilité des cellules chromaffines sur tranches de tissu) et iii) en sécrétion (dosage des catécholamines).

En pratique, cette étude utilisera 368 souris réparties en 7 groupes de 56 à 62 animaux, selon qu'il s'agisse d'animaux opérés mais non injectés, injectés par une construction contrôles ou injectés par une construction test. Ces calculs prennent en considération le taux de mortalité inhérent à la procédure chirurgicale ainsi que le taux d'échec de la transduction virale dans la zone d'intérêt. Satisfaisant aux 3R, nous avons effectué une recherche bibliographique afin d'identifier de possibles approches alternatives in vitro. Ces méthodes, basées sur la culture de tissus, sont, pour cette étude, inappropriées car elles ne permettent pas une étude satisfaisante sur des animaux adultes. Le nombre d'animaux sera réduit grâce à une approche rationnelle, associant plusieurs prélèvements sur un même animal et un nombre d'animaux par lot approprié pour des analyses statistiques fiables. Une médication analgésique et anti-inflammatoire sera mise en œuvre pour réduire la douleur. Egalement, une habituation des animaux à leur environnement ainsi qu'un hébergement en cage enrichie contribuera à leur bien être. Ces mesures de raffinement permettront de diminuer les états de stress, d'augmenter la reproductibilité des résultats et par conséquent contribueront à réduire le nombre d'animaux.

**9566** Cette étude a pour but principal la détermination de la meilleure technique pour la mise en place d'un vaccin pour lutter contre les infections dues aux entérovirus. Cette étude est prévue pour 3 ans et va nécessiter l'utilisation de 94 animaux, des souris RjOrl : swiss. Les mesures suivantes seront mises en place afin de respecter la règle des 3R.



- Remplacer : cette étude chez l'animal constitue la dernière étape de ce projet de recherche. Elle ne peut malheureusement pas être remplacée par une technique *in vitro*, car elle met en œuvre plusieurs mécanismes physiologiques impossibles à reproduire *in vitro*. Les premières étapes du projet ont cependant été réalisées *in vitro*, ce qui a permis d'éviter l'utilisation d'animaux pour d'éventuels tests préliminaires.

- Réduire : notre protocole prévoit un nombre d'animaux minimum et suffisant afin de limiter autant que possible leur utilisation et, en même temps, permettre une analyse statistique significative des résultats. Il est également prévu d'assurer un suivi régulier des animaux afin de recueillir un maximum d'informations et éviter ainsi la répétition évitable d'expériences.

- Raffinement : afin de limiter les contraintes, le stress et la douleur, il n'est prévu qu'un nombre limité d'inoculations du produit à tester. Les manipulations se feront à distance des autres animaux et un suivi régulier de l'état général et du poids sera assuré afin de détecter, de façon précoce, les animaux qui manifesteraient des signes de souffrance et d'y remédier. Les conditions d'hébergement des animaux seront aussi améliorées en assurant un enrichissement optimal de leur environnement. Les différentes informations issues de cette étude seront très utiles dans la mise en place d'un vaccin efficace pour lutter contre les entérovirus.

**9567** Le rat-taupe nu est un petit rongeur qui vit en captivité plus de 31 ans. C'est l'espèce de rongeur qui vit le plus longtemps. Par exemple, il vit 10 fois plus que la souris de laboratoire qui vit en moyenne 3,5 ans.

Le rat-taupe nu affiche une sénescence négligeable caractérisée par des changements très lents ou absents dans les paramètres physiologiques du métabolisme, de la composition du corps ou de la densité minérale osseuse et son taux de mortalité n'augmente pas avec l'âge comme il le fait dans d'autres espèces.

En outre, il a une résistance unique face à de nombreuses maladies liées à l'âge, y compris les maladies cardiovasculaires ou les cancers.

Le rat-taupe nu représente un modèle unique de vieillissement réussi ne montrant pratiquement pas de déclin de la plupart des fonctions physiologiques.

Les mécanismes associés à la longévité sont encore aujourd'hui assez mal connus. Plusieurs études récentes ont montré que des altérations du métabolisme influençaient la longévité dans des modèles animaux, ces altérations se traduisent notamment par des changements dans la signature métabolomique, c'est à dire la composition de l'organisme et du sang en petites molécules, les métabolites, tels que les intermédiaires métaboliques, les hormones et autres molécules signal ainsi que les métabolites secondaires.

Par exemple, des études chez *Caenorhabditis elegans*, un petit ver caractérisé par un cycle de vie extrêmement bref, ont montré que de nombreuses mutations augmentant la longévité via des changements au niveau du métabolisme et des enzymes du métabolisme. De la même façon, chez la souris et chez l'homme, l'évolution de la signature métabolomique avec l'âge montre que le vieillissement s'accompagne de changements métaboliques prévisibles.

L'hypothèse est que le déclin physiologique des organes importants pour le métabolisme (foie, muscle, pancréas...) et donc le déclin physiologique dans son ensemble pourrait se refléter dans le profil métabolomique de l'organisme. L'identification de cette signature métabolomique chez le rat-taupe nu, un animal dont le vieillissement est négligeable, est une étape indispensable pour établir les mécanismes mis en jeu par cet animal pour résister au vieillissement. Ce type d'activité de recherche implique le recours aux animaux de cette espèce pour des raisons flagrantes.

Pour mener cette étude nous envisageons de réaliser des prélèvements sanguins sur 20 animaux de notre colonie reproductrice (10 jeunes de moins d'un an et 10 individus âgés de plus de 5 ans). Ce nombre est nécessaire pour obtenir suffisamment de matériel biologique mais aussi pour détecter des différences entre les individus. Afin de réduire l'impact pour les animaux, ces prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale et les animaux ne seront pas séparés du groupe pour une durée supérieure à une heure.

**9568** Certains patients atteints de cancer et traités par chimiothérapie, présentent une anémie qui est soignée par injection d'érythropoïétine (EPO). Cependant des études cliniques montrent que certains

de ces patients redéveloppent plus rapidement des tumeurs, conduisant à une réduction de leur survie.

En dépit des efforts fournis ces dernières années par la communauté scientifique et l'utilisation de nombreux modèles expérimentaux, aucun mécanisme lié à l'EPO, permettant d'expliquer ce développement tumoral accru n'a pu être démontré. Une des hypothèses pour expliquer cela serait que l'EPO pourrait bloquer à différents niveaux les cellules du système immunitaire, importantes pour combattre les tumeurs. L'objectif de ce projet est donc d'explorer les impacts d'un traitement à l'EPO ou d'un blocage de l'EPO produite par l'organisme (endogène) sur le système immunitaire.

Le système immunitaire chez l'homme est complexe. Dans ce contexte, cette étude nécessite un modèle d'étude disposant d'un système proche du notre, comme celui de la souris. Cette étude ne peut en aucun cas être menée sur d'autres modèles animaux (drosophile, poisson zèbre ou nématode) n'ayant pas du tout les mêmes propriétés immunitaires.

Nous proposons de développer deux modèles murins : 1) un modèle de gain de fonction dans lequel les souris seront traitées avec de l'EPO. 2) un modèle de perte de fonction (fKO) dans lequel l'EPO endogène des souris sera neutralisée grâce à l'injection de sérum contenant des anticorps bloquants. Ces deux modèles nous permettront d'élucider l'impact d'un traitement à l'EPO sur le système immunitaire. Cette étude nécessite d'être menée sur deux souches différentes de souris afin de refléter ce qui se passe chez l'homme et donc de comprendre pourquoi le traitement à l'EPO induit des effets secondaires néfastes seulement chez certains patients.

Nous mettrons en place un système non-invasif pour le suivi du développement tumoral. Ce système nous permettra également de réduire le nombre de souris utilisées.

L'ensemble de ce projet requiert un nombre total maximal d'animaux de 1408 souris. De plus, notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R : Réduction, en pratiquant des analyses d'ordres phénotypique, cellulaire et moléculaire sur le même animal ; Remplacement, par l'utilisation de systèmes cellulaires pour les approches biochimiques ; et Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants et un suivi tous les deux jours des souris qui nous permettra de détecter rapidement des signes de souffrance et de détresse de l'animal.

Ainsi le rôle de l'EPO élucidé, d'autres traitements seront prescrits aux patients atteints de cancer pour éviter la progression et la récurrence de leur tumeur.

**9569** Des perturbations nutritionnelles ou autres stress appliqués durant des périodes critiques du développement (préconception, conception, gestation, lactation), prédisposent l'individu adulte aux pathologies métaboliques et cognitives indiquant que l'environnement périnatal peut exercer des effets à long terme sur la santé. Cependant, peu de données sont disponibles quant à l'influence éventuelle de modifications de l'environnement périnatal sur le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA). Notre hypothèse est qu'une perturbation de l'environnement périnatal pourrait, en modifiant le développement précoce du cerveau, sensibiliser au développement de la MA. Pour tester cette hypothèse nous appliquerons, chez des souris normales ou prédisposées à développer des troubles relatifs à la MA, un régime carencé en protéine pendant la gestation et/ou la lactation et nous en étudierons les conséquences sur le métabolisme des descendants leur cognition et des protéines connues pour être impliquées dans la MA. Il s'agit d'une approche expérimentale pertinente et novatrice pour tester l'hypothèse d'une implication de l'environnement précoce sur le développement de la MA. Notre projet répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Le nombre total d'animaux concernant ce dossier sur les 5 ans à venir est estimé à 1300 (reproducteurs et progéniture). Les animaux seront suivis précisément pour chaque protocole, pour lesquels des points limites adaptés ont été définis. Toute souffrance, angoisse ou comportement inhabituel sera pris en charge par des approches appropriées. Ces évaluations particulières ne peuvent être réalisées en utilisant une alternative aux animaux

**9570** Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD) sont les maladies hépatiques les plus fréquentes dans les pays industrialisés, associées à l'obésité et au diabète de type 2. La stéatose se caractérise par une accumulation de graisses dans les cellules du foie (les hépatocytes). Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH) qui favorise l'apparition d'une cirrhose et dans certains cas le

développement d'un cancer du foie (hépatocarcinome ou CHC). La présence de stéatose est rapportée sur environ 20 à 30% des biopsies hépatiques réalisées dans la population générale, et celles de la NASH dans 2 à 3 %. La définition correspond à des lésions, comparables à celles objectivées lors des intoxications alcooliques chroniques, en l'absence de prise significative d'alcool (> 20 à 30 g/j chez l'homme, > 20 g/j chez la femme), ou d'association à d'autres maladies hépatiques chroniques (virales ou toxiques). Les lésions de stéatose sont classiquement notées chez la majorité des malades obèses (60 à 75%), diabétiques (21 à 78%) et avec un taux élevé de lipides dans le sang (50 %). Les lésions de NASH sont objectivées chez environ 20% des malades obèses. Cependant les lésions de NASH peuvent également être notées chez des malades sans surpoids (3%), ni diabète patent. Ces lésions vont de la simple stéatose qui possède une évolution bénigne, à des lésions de stéato-hépatites dites évolutives et qui sont responsables de l'apparition d'une fibrose hépatique et de véritable cirrhose pouvant se compliquer en cancer du foie. La NASH n'est pas le résultat d'une lésion en particulier, mais plutôt la « coexistence » de plusieurs lésions incluant une stéatose, une dégénérescence des cellules du foie et des infiltrations de cellules inflammatoires dans le foie. Les mécanismes conduisant au développement de la NASH n'ont, à ce jour, pas été formellement élucidés et l'hypothèse d'une pathologie multifactorielle reste la plus probable. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la NASH est devenue un enjeu majeur de santé publique. Récemment, il a été montré que l'augmentation de l'expression du récepteur TREM-1 au niveau des cellules inflammatoires dans le foie était corrélée à la sévérité de l'inflammation de la NASH et par conséquent, son inhibition pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Dans cette étude, nous voulons donc évaluer le potentiel thérapeutique d'un peptide inhibiteur de TREM-1 pour le traitement de la NASH chez la souris. Pour cela, nous souhaitons utiliser un organisme vivant pour tester le(s) effet(s) du peptide sur les différents symptômes que représente la NASH. A ce jour, la souris reste le meilleur modèle représentatif de la NASH rencontré chez l'homme et ainsi les résultats de cette étude pourraient représenter les premiers éléments du développement d'une nouvelle thérapie pour la NASH chez les patients.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche in vitro qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle comme la NASH. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (système immunitaire, microbiote intestinal, etc...) contribuant au développement de la NASH et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

2. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 72 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera 8 animaux : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La pathologie (NASH) sera induite par l'administration d'un régime alimentaire carencé en méthionine et choline durant 5 semaines. Cette méthodologie est fréquemment utilisée pour induire une NASH expérimentale représentative de celle observée chez l'homme. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide durant 5 semaines par un personnel technique qualifié. Le peptide utilisé a déjà montré ses effets bénéfiques dans le traitement d'autres pathologies comme le choc septique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques.

Le projet proposé vise la validation préclinique de nouveaux adhésifs chirurgicaux capables de fixer fermement mais temporairement et sans traumatisme des membranes et des pansements sur les tissus et organes internes. Il s'appuie sur la découverte récente d'une nouvelle approche de l'adhésion sur des tissus biologiques utilisant les phénomènes d'adsorption des macromolécules composant les tissus à la surface de particules inorganiques. Ainsi, des membranes et des pansements revêtus de telles particules peuvent devenir adhérents aux tissus vivants et peuvent être détachées sans créer d'endommagement. Les performances adhésives mesurées avec ces nouveaux systèmes sur des tissus animaux ex vivo sont prometteuses et suggèrent des perspectives d'amélioration des pratiques chirurgicales et des traitements thérapeutiques en médecine interne. En particulier, l'adhésion produite permettrait de concevoir des membranes hémostatiques (arrêtant des saignements incontrôlés) ou en encore de fixer des marqueurs indispensables pour le développement de nouvelles technologies utilisant la réalité virtuelle pour guider certaines opérations difficiles en chirurgie ouverte hépatique. Cependant, la forte sensibilité connue de l'adhésion à l'état d'hydratation des tissus et les effets liés à la coagulation du sang rendent indispensables le passage par des essais in vivo pour valider ces performances dans des conditions représentatives de la réalité clinique.

Nous proposons une étude préclinique utilisant des essais d'adhésion in vivo sur cochons. Deux types d'essais seront réalisés en situation de chirurgie ouverte. Un premier type d'essais visera la mesure de la force d'adhésion de membranes bioadhésives à la surface (capsule) du foie. Pour cela, des patches seront déposés sur le foie puis décollés après un temps déterminé. La force de décollement sera mesurée à l'aide d'un dynamomètre portable. Un second type d'essai visera l'évaluation du pouvoir hémostatique des membranes bioadhésives. Pour cela, un saignement modéré sera créé à la surface du foie et la zone saignante sera couverte par un patch adhésif. La performance hémostatique sera caractérisée en évaluant le temps d'arrêt du saignement, la quantité de sang exsudée, la force de décollement et la formation d'un caillot après retrait de la membrane. Le nombre optimisé d'animaux estimé pour la réalisation de l'étude est de 8 animaux.

Une attention particulière est portée au respect des règles des 3R de l'expérimentation animale qui sont prises en compte de la façon suivante :

- Remplacement : Une étude ex vivo préliminaire sur foie porcin a permis d'optimiser la performance adhésive des membranes et de déterminer quelques compositions censées être les plus efficaces in vivo. Cependant, une validation in vivo est indispensable car aucun protocole in vitro ou ex vivo ne permet de reproduire correctement l'influence de l'hydratation active des tissus et de la coagulation sanguine sur l'adhérence des membranes. Le modèle envisagé est celui du cochon qui est le modèle animal de référence pour la validation d'hémostatique et d'adhésifs en chirurgie hépatique et digestive. En particulier, la nature des tissus hépatiques et les flux sanguins chez le cochon sont proches de ceux rencontrés chez l'Homme, ce qui n'est pas possible à obtenir avec des modèles petits animaux type rongeur.

- Raffinement : Les essais proposés ne requiert pas de suivi post-opératoire ni que les animaux soient en état éveillé. Par ailleurs, les procédures d'essais sont peu traumatisantes, même pour les essais d'hémostase qui produisent un saignement modéré par biopsie. Les animaux seraient donc endormis pendant les essais en chirurgie ouverte et euthanasiés sans réveil.

- Réduction : Le nombre d'essais proposés pour valider les performances de ces nouveaux adhésifs inclut les contrôles négatifs (membranes sans revêtement adhésif) et positifs (adhésifs chirurgicaux existants de type colles cyanoacrylates ou colles biologiques à base de fibrine) ainsi que plusieurs combinaisons de membranes (N=3) et de revêtements de particules (N=3) déjà sélectionnés sur la base d'essais ex vivo. Pour être statistiquement représentatif chaque essai doit être répété au moins 6 fois, soit un total d'environ 80 mesures d'adhésion et 80 mesures d'hémostase. En réalisant sur un même foie des essais d'adhésion suivis d'essais d'hémostase et en exploitant au maximum la surface des deux lobes de foie accessibles, il serait possible d'obtenir 15-20 mesures d'adhésion et 10-12 mesures d'hémostase par animal. Ceci permettrait alors de réduire l'étude à un nombre total de 8 animaux.

**9572** La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Cette approche thérapeutique a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe.

Néanmoins, seulement 20% des patients transplantés restent insulino-indépendants après 5 ans, révélant un échec de la greffe à long terme. De plus, cette perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie.

La phase initiale de la greffe paraît elle aussi délicate, dans la mesure où elle se heurte à 2 obstacles importants :

Le faible nombre d'îlots obtenus à partir d'un pancréas et donc la nécessité de recourir à plusieurs donneurs,

La perte cellulaire importante des îlots à l'implantation (réaction inflammatoire, stress oxydant et défaut secondaire de vascularisation).

Ainsi, le but de notre recherche, dans lequel s'inscrit cette saisine, est d'améliorer la survie des îlots pancréatiques pré et post implantation en nous focalisant sur :

La compréhension des mécanismes impliqués dans la perte des îlots pancréatiques au cours des procédures d'isolement et de culture afin de diminuer les effets délétères de l'isolement, d'améliorer les conditions de survie de l'îlot post-isolement en culture et de proposer des modifications de procédure.

L'identification des mécanismes cellulaires à l'origine des difficultés d'implantation initiale des îlots (stress oxydant et IBMIR) et du défaut d'angiogenèse de ceux-ci afin de développer de nouvelles stratégies d'optimisation spécifiques répondant à ces mécanismes.

Après validation, ces modifications seront appliquées sur l'isolement d'îlots de porc et d'îlots humains à visée scientifique.

Nous avons pour objectif d'étudier certaines étapes de la procédure, la première étant l'extraction des îlots, la seconde la culture et la troisième la transplantation. Par ailleurs, l'ensemble des informations qui seront récoltées nous seront essentielles pour la mise au point d'un pancréas bio artificiel.

Ainsi, l'objectif de cette saisine est d'obtenir des îlots pancréatiques de Rat qui représentent la source cellulaire nécessaire et indispensable pour l'identification et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perte des îlots pancréatiques pré et post transplantation. Ces études *in vitro*, nous permettront d'améliorer les procédures d'isolement des îlots et de développer des stratégies d'optimisation de leur survie post-greffe chez le patient diabétique.

Le rat est le modèle de choix pour ce type d'étude, car l'homogénéité des souches est importante pour déterminer des tendances et est le modèle d'étude standard. De plus, les isollements de rats sont 100 fois moins onéreux que les isollements d'îlots de porc ou d'humain. Pour cela, nous travaillerons sur le modèle de Rat Wistar mâle à raison de 5190 rats sur les 2 ans de la demande.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques. La souffrance des animaux sera réduite au maximum avec la mise en place de points limites et le rajout d'anti douleur si nécessaire. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture *ad libitum*. Les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire.

**9573** La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente, après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 150000 personnes en France avec environ 14000 nouveaux cas par an. La prévalence de la maladie augmentant avec l'âge, cette maladie dramatique pose des problèmes considérables en termes de santé publique en raison de l'augmentation de l'espérance de vie. Cette pathologie est caractérisée par des symptômes moteurs tels qu'une difficulté à effectuer des mouvements, ou des tremblements pouvant s'associer à des symptômes cognitifs moins connus. Le traitement pharmacologique (Levodopa) et/ou la stimulation cérébrale profonde (« Deep Brain Stimulation », DBS) réduisent la plupart des symptômes liés à la maladie de Parkinson. Cependant, les déficits de la marche répondent de manière modérée à ces traitements sus-mentionnés. La locomotion des patients souffrant de la maladie de Parkinson est affectée. En effet, des petits pas, une démarche lente, des déficits dans le contrôle de la balance corporelle ainsi que des périodes de

blocage (« freezing ») pendant lesquelles il est difficile d'initier la locomotion sont caractéristiques de la maladie de Parkinson.

Les mécanismes neuronaux provenant du cortex qui sont responsables d'activer et moduler les centres locomoteurs spinaux sont peu connus. Dans la présente étude, nous proposons d'explorer l'impact de la maladie de Parkinson sur ces interactions cortico-spinales qui contrôlent l'initiation et l'exécution de la locomotion. Ainsi, nous élaborerons une interface cerveau-moelle épinière qui atténuera les déficits de la marche en améliorant la communication de ces circuits.

De récentes études ont montré que la neuromodulation électrique de la moelle épinière améliore la locomotion chez les modèles Parkinson du rongeur et des marmosets. Cependant, les premières évaluations chez les patients souffrant de la maladie de Parkinson ont mené à des succès mais aussi des échecs. En effet, lors des essais cliniques, la localisation ainsi que les paramètres des protocoles de stimulation spinale étaient rudimentaires et basés sur des observations empiriques. De plus, la stimulation était délivrée de manière continue sans prendre en compte l'état du mouvement (position de la jambe, etc) et/ou l'intention à marcher. Ces limitations pourraient expliquer la variabilité des effets thérapeutiques observés. Au cours de la dernière décennie, nous avons établi un cadre technologique qui a permis de raffiner les protocoles de stimulation spinale afin de recruter les synergies musculaires des extenseurs et des fléchisseurs de la jambe. Nous avons créé une interface entre l'activité du cortex moteur primaire de la région de la jambe avec les stimulations spinales afin de recruter sélectivement et spatialement les synergies musculaires. Cette interface, appelée « interface cerveau-moelle épinière » (brain-spine interface, BSI), a restauré la locomotion chez un modèle de primate non-humain de lésion de la moelle épinière seulement 6 jours post-lésionnel.

Nous proposons d'exploiter ce concept technologique afin d'étudier la relation entre les activités cérébrales du cortex moteur primaire et l'activation des motoneurones de la jambe chez le singe rhésus avant et après la perte des neurones dopaminergiques. Afin de mener ces expériences, nous utiliserons le modèle du singe-MPTP qui est connu pour être le meilleur modèle de la maladie de Parkinson chez le primate.

Une fois ces connaissances scientifiques acquises, elles pourront nous guider afin de concevoir cette interface cerveau-moelle épinière où l'intention du mouvement de la jambe est liée à la stimulation spinale promouvant le mouvement. Notre projet pourra ainsi augmenter nos compréhensions de la défaillance locomotrice suite à une perte de neurones dopaminergiques dans les ganglions de la base et nous fournira la démonstration de concept sur l'habileté de l'interface cerveau-moelle épinière d'améliorer les déficits locomoteurs suite à la maladie de Parkinson. De plus, un essai clinique évaluant l'efficacité thérapeutique de cette stratégie est actuellement en cours à l'hôpital universitaire sur des patients souffrant de lésions de la moelle épinière. Ceci suggère qu'une telle stratégie thérapeutique pourrait être translatée chez des patient souffrant de la maladie de Parkinson.

Nous utiliserons pour ce projet 10 animaux, qui seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, "jouet", fond sonore ...). Toute intervention nécessaire à l'expérimentation sur l'animal sera réalisée sous anesthésie locale ou générale et complétée par l'utilisation d'analgésiques afin d'assurer le meilleur confort qui soit. Les points limites seront respectés ce qui nous amènera à prendre les dispositions qui s'imposent de la façon la plus précoce et la plus adaptée possible. Pour cela, tous les animaux seront surveillés pluri quotidiennement par nos techniciens animaliers et par les chercheurs formés et habitués à inter agir avec ces espèces animales. Cela permettra de discuter au cas par cas des soins à apporter à l'animal en fonction des besoins.

**9574** La formation des chirurgiens nécessite des apprentissages pratiques aussi bien que théoriques : après de nombreuses séances d'observation vidéos et des simulations de chirurgie sur des pièces anatomiques et des substituts, il est encore nécessaire de recourir à des séances de formation avec des animaux vertébrés pour se retrouver dans la situation d'un tissu vivant, mobile et vascularisé. Les enseignements de microchirurgie peuvent être réalisés avec des rongeurs, car leurs vaisseaux et nerfs ont une taille et une structure comparables à des cibles d'intérêt médical de l'homme. Ces séances, réalisées en nombre limité dans le cadre d'un programme de formation, ont pour objet de finaliser l'apprentissage technique de microdissection et sutures sous microscope opératoire.

En moyenne, de 2012 à 2017, nous avons diminué de plus de 50% du nombre d'animaux utilisés pour la formation d'un stagiaire.

Un maximum de 3000 rats est prévu sur 5 ans pour l'ensemble des formations initiales et continues des chirurgiens en microchirurgie vasculaire et nerveuse dans plusieurs domaines d'application médicale courante (pontage coronarien, anévrisme cérébral et greffe.).

Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation douce et calme d'animaux habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. Le nombre des animaux est réduit au minimum grâce à une gestion soigneuse des actes pratiques réalisés par chaque stagiaire et à une révision pédagogique constante.

**9575** Le glyphosate est l'une des substances actives (SA) herbicides les plus largement utilisés dans le monde, entrant dans la composition de nombreux produits phytosanitaires. Son utilisation extensive fait qu'il est très largement retrouvé dans les masses d'eaux superficielles et souterraines. Si les propriétés physico-chimiques de la SA sont plutôt en faveur d'une certaine innocuité environnementale, des études récentes ont néanmoins révélé des effets cancérigène, génotoxique, neurotoxique et tératogène chez différents organismes. De même, il semblerait que certains tensioactifs utilisés dans les formulations des produits phytosanitaires commercialisés génèrent une toxicité supérieure à la SA seule. Les données disponibles à l'heure actuelle permettant d'évaluer l'innocuité sanitaire et environnementale du glyphosate divisent les experts dans un contexte où le renouvellement de son autorisation se pose au sein de l'Union européenne.

Le projet présenté ici a pour objectif d'améliorer les connaissances sur l'impact du glyphosate et de ses adjuvants sur l'environnement, la santé et le bien-être des animaux. L'écotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou co-formulé sera évaluée sur plusieurs générations de truites arc-en-ciel (TAC). Une première procédure expérimentale a été menée en 2017 où des géniteurs ont été exposés de manière chronique au pesticide, suivant quatre conditions, témoins, SA seule et deux produits phytosanitaires (PP1 et PP2). Ces quatre lots de géniteurs ont engendré quatre descendances (F1) avec des histoires de vie prénatale différentes. Il est alors question d'évaluer l'état de santé de ces quatre nouvelles générations face à différents stress environnementaux, tels qu'une exposition chimique aigue ou chronique ou encore une maladie virale. Pour ce faire, trois expérimentations seront menées.

Tout d'abord, 900 alevins issus des géniteurs précédemment contaminés au glyphosate seront exposés pendant 96h à 100 µg/L de glyphosate via la SA ou un PP afin d'évaluer l'impact d'une contamination aigue en glyphosate et de tester la réponse de nouveaux biomarqueurs d'intérêt pour la suite de l'étude. Puis, 1000 alevins issus de géniteurs précédemment contaminés au glyphosate seront exposés de manière chronique au glyphosate pendant près de 2 ans jusqu'à leur maturité sexuelle afin d'obtenir une seconde descendance (génération F2). L'impact de la contamination prénatale, directe et transgénérationnelle au glyphosate sera évalué sur les capacités de défense et de reproduction de ces nouvelles générations. Enfin, 4000 alevins issus de géniteurs contaminés et ayant eux-mêmes subi la contamination directe en glyphosate, seront éprouvés à une infection virale expérimentale afin d'évaluer le potentiel global des défenses immunitaires des poissons face à la maladie. Au total, 5900 animaux seront utilisés.

Ces trois procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement dans la gestion des lots de poissons. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux : volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de vie mais également d'appliquer des mesures pour réduire la douleur des individus pendant les procédures expérimentales. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écotoxicologie et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ces travaux. Enfin, des prélèvements de sang et d'organes cibles (branchies, foie, rate) seront effectués lors des trois procédures pour suivre des biomarqueurs d'exposition et d'effet. Ainsi, la bioaccumulation en molécules chimiques, les

activités enzymatiques des défenses antioxydantes ou encore l'expression de gènes d'intérêt liés à la réponse immunitaire pourront être étudiés.

**9576** L'hémophilie A est une maladie génétique liée à une mutation du chromosome X, touchant approximativement une naissance sur 5000 chez les individus de sexe masculin. Les individus touchés produisent peu ou pas de facteur de coagulation VIII, une protéine jouant un rôle central dans la "cascade de coagulation". Ces patients courent donc le risque de mourir d'hémorragies non maîtrisées et subissent de fréquents saignements spontanés, en particulier dans les articulations, causant ainsi de l'arthrose. Les thérapies existantes impliquent l'administration intraveineuse plusieurs fois par semaine de concentrés de facteurs VIII d'origines humaine ou recombinante. Cette thérapie, déjà très lourde pour le patient, a aussi l'inconvénient d'être rendue inefficace par le développement de résistance chez 30% des patients. En conséquence, il est urgent de développer des thérapies alternatives, notamment par la mise au point d'anticorps remplaçant le facteur VIII et rétablissant ainsi une cascade de coagulation fonctionnelle. De telles thérapies auraient le double avantage d'éviter des réactions de résistances par le patient et de pouvoir être administrées par de simples injections sous-cutanées.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests in vivo chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont indispensables pour compléter les données obtenues in vitro. Dans ce projet, l'utilisation du modèle primate non humain (PNH) se justifie par les spécificités des molécules à étudier. En effet, les protéines interagissant avec le facteur VIII sont similaires entre l'Homme et le PNH, mais sont totalement différentes de celles des rongeurs. Plus spécifiquement, il a été démontré que des molécules similaires à celles impliquées dans ce projet sont inefficaces chez le rongeur.

Le projet sera divisé en deux procédures. La première procédure visera à mettre au point et à caractériser le modèle PNH d'hémophilie A par injection intraveineuse d'un anticorps inactivant le facteur VIII. Les résultats de l'étude 1 permettront de déterminer la faisabilité de l'étude 2. Dans la deuxième procédure, tous les animaux recevront le même traitement hémophilisant que dans la procédure 1, mais la moitié d'entre eux recevra aussi un anticorps visant à remplacer le facteur VIII inactivé (les animaux restant servant de contrôles). Cette procédure impliquant l'injection sous-cutanée d'anticorps thérapeutiques pourra être répétée afin d'explorer de nouvelles pistes de soin pour l'hémophilie A. Dans les deux procédures, des prélèvements sanguins de faible volume ainsi que des tests de temps de saignements seront effectués afin de suivre l'évolution et l'efficacité du traitement. Les données recueillies en fin de procédure permettront de caractériser les effets des traitements sur l'état des articulations des animaux.

Pour ce projet, déposé pour une durée de 5 ans, il est prévu d'utiliser au maximum 59 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés, soit 59 animaux sur 5 ans, a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'Homme. Dès leur arrivée, les animaux seront examinés par un vétérinaire, pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis individuellement et quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Le suivi clinique des animaux (de visu et via caméra) mettra l'accent sur les signes cliniques qui pourraient être entraînés par les traitements, et une grille d'évaluation spécifique sera développée. De plus, un traitement analgésique sera implémenté afin de diminuer la douleur qui pourrait être induite par les traitements. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress pouvant être engendré par les manipulations et une attention particulière sera donnée à l'enrichissement de l'environnement des animaux.

**9577** Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active pré existante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une



réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie.

L'objectif de notre étude est de caractériser le potentiel des ultrasons focalisés à remplir le rôle de traitement complémentaire pour améliorer la réponse aux immunothérapies.

Les ultrasons thérapeutiques sont aujourd'hui utilisés en clinique pour le traitement du cancer de la prostate et sont à l'étude comme traitement prometteur de nombreuses autres tumeurs solides. Ils présentent l'avantage d'être non invasifs et bien tolérés. Ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour traiter de manière systémique, et particulièrement les métastases à distance, première cause de mortalité après un traitement HIFU. Ces traitements par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) reposent sur une focalisation d'un faisceau d'ondes ultrasonores pour concentrer l'énergie acoustique dans une zone, dont la taille typique est similaire à celle d'un grain de riz. Dans cette région très localisée, il est possible d'induire des effets thermique ou mécanique afin de détruire les cellules tumorales.

Des travaux récents ont montré que les HIFU pourraient avoir une action locale et systémique sur la réponse immunitaire anti-tumorale, ouvrant la voie à de nouvelles modalités de traitement.

L'hypothèse de travail de cette étude est qu'il est possible d'induire une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par un traitement ultrasonore et que cette stimulation pourrait se traduire par une action systémique et potentialiser les immunothérapies.

L'objectif de cette étude est donc de caractériser la réponse immunitaire et l'efficacité clinique induite par un traitement ultrasonore focalisé combiné à un traitement d'immunothérapie afin de quantifier l'effet synergique potentiel de cette combinaison. Un traitement ultrasonore focalisé mécanique sera combiné avec un anticorps anti-PD1, une des immunothérapies les plus étudiées actuellement. Une recherche du timing optimal menant à un effet maximal au niveau de la réponse immunitaire intra tumorale et de la réponse clinique sera effectuée. Cette étude sera réalisée sur un modèle murin syngénique non orthotopique d'adénocarcinome de côlon, le modèle MC38.

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : le nombre d'animaux sera réduit à minima, avec un nombre total de 480 souris pour 24 lots. L'étude de la réponse immunitaire est rendue impossible in vitro de par la complexité des interactions des cellules de l'immunité avec l'environnement tumoral. L'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale face à un traitement ne peut être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Une définition précise des points limites est donnée ci-après, et seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, ajout de cotons, ...) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement sélectionnés par simulations numériques et tirs sur tissus ex vivo.

**9578** La greffe d'îlots pancréatiques est aujourd'hui une thérapie prometteuse pour les diabétiques de type 1 présentant des épisodes d'hypoglycémie sévère. Cependant, le nombre de pancréas nécessaires pour obtenir suffisamment d'îlots permettant de restaurer l'insulino-indépendance est élevé et limite le nombre de patients y ayant accès. Une perte importante d'îlots est enregistrée pendant la procédure et est en partie due aux phénomènes d'ischémie reperfusion. L'objectif de ce projet est d'améliorer la survie des îlots pré et post-transplantation en préparant le pancréas du donneur en amont de la procédure par un pré-conditionnement ischémie/reperfusion à distance. Le pré-conditionnement consiste en l'habituation des cellules à un phénomène traumatique par une exposition répétée à ce même phénomène mais suffisamment courte (ici ischémie reperfusion) pour ne pas déclencher la mort cellulaire. Il peut se faire par clampage direct de l'organe ou à distance par clampage d'un autre organe ou par un garrot. Les cellules ainsi exposées vont se préparer à subir ce type de stress et mettre en place une défense adaptée (anti-oxydante, anti-inflammatoire). En activant les défenses intrinsèques de l'organe, il serait donc possible de protéger le pancréas et surtout les îlots pancréatiques d'optimiser la fonction du greffon. Le clampage local (artère mésentérique) a montré des résultats intéressants quant à la survie des îlots pancréatiques in vivo mais la transposition en clinique de cette technique semble compliquée. Ainsi, le but de cette étude est d'obtenir par clampage de la fémorale au moyen d'un garrot les mêmes effets que par clampage mésentérique. Les études combinées sur la survie des îlots in vitro et in vivo, la respiration

mitochondriale et la métabolomique vont permettre de déterminer si le pré-conditionnement à distance permet de diminuer les dommages cellulaires, l'hypoxie, le stress oxydant et l'inflammation. Le projet se déclinera en 2 étapes et sera mené chez le Rat. La première étape qui nécessitera 280 rats wistar, permettra de mettre en place le modèle de pré-conditionnement ischémique (PCI) du pancréas et de déterminer si le PCI permet d'augmenter le rendement et la survie des îlots pancréatiques in vitro. En parallèle, il sera vérifié que les PCI utilisés ne sont pas délétères sur d'autres organes. La deuxième étape, qui nécessitera 673 rats Lewis, aura pour objectif de confirmer les effets bénéfiques de PCI en étudiant cette fois in vivo la survie des îlots pancréatiques après transplantation intraportale chez le Rat diabétique. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude. Des anti douleurs seront mis en place si nécessaire ainsi que des points limites.

**9579** Le but de ce projet est de développer un nouveau collyre pour la dilatation de la pupille, dit mydriatique, qui sera utilisé lors d'examen du fond d'œil ou avant certaines interventions chirurgicales comme la cataracte.

Aujourd'hui, les collyres sont éliminés rapidement de la surface oculaire par les larmes et le clignement des paupières, ce qui conduit à une faible efficacité. Des administrations répétées sur une période de 45 minutes sont donc nécessaires pour obtenir l'effet escompté.

Ce nouveau collyre est une solution gélifiante, facile à administrer et devrait permettre d'obtenir la dilatation avec une seule goutte.

Ici, l'objectif est donc d'évaluer le temps d'élimination de la formule sur la surface oculaire. Dans le même temps, l'efficacité de notre produit sera vérifiée en observant et en mesurant la durée et l'intensité de la dilatation.

Le protocole soumis ici sera réalisé chez le lapin albinos qui est un animal de choix pour les études oculaires en raison de la taille de l'œil de l'animal qui est proche de celle de l'homme et le caractère albinos permettant de bien visualiser les éventuelles phénomènes d'irritation oculaire comme une légère rougeur.

Ce protocole simple consiste en l'administration d'une goutte de la solution à tester à la surface de l'œil de l'animal qui sera ensuite observé par des techniques d'imagerie non invasives. Des essais de comportement de la formulation ont été réalisés in vitro. Il est maintenant indispensable de poursuivre ces observations in vivo.

Deux techniques utilisées classiquement chez l'homme seront comparées :

-Observation à la lampe à fente, technique utilisée pour visualiser le film lacrymal coloré par une goutte de fluorescéine, ainsi que l'état général de l'œil.

-Observation au kératographe, qui permet d'évaluer à la fois le film lacrymal (première couche de la surface oculaire) ainsi que le diamètre de la pupille.

Par ailleurs les formules seront couplées à une sonde fluorescente (validée in vivo lors d'études précédentes) afin de suivre leur élimination de la surface de l'œil :

-Observation à l'aide d'une caméra à fluorescence. Cette technique pourrait permettre de visualiser une formule fluorescente sur la surface oculaire.

Ce projet nécessite l'utilisation de 54 lapins. Trois formules seront testées, ce nombre permettra donc d'obtenir des données statistiques suffisantes pour interpréter les résultats obtenus.

Ces tests non douloureux seront effectués sur l'animal éveillé. Les lapins seront surveillés tout au long de l'expérimentation et une grille d'évaluation de la douleur a été mise en place. Dans l'éventualité où un lapin dépasserait le score de douleur prédéfini, il serait sorti de l'étude et soigné par un traitement local adapté par le vétérinaire de l'animalerie.

A l'issue de l'expérimentation, tous les lapins seront placés en famille d'accueil, aucune euthanasie n'est prévue lors de cette étude.

**9580** Le tube digestif est un organe vital doté de fonctions antagonistes, qui joue un rôle majeur dans la digestion et l'absorption des nutriments alimentaires et qui, parallèlement, constitue la barrière la plus importante entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur. La capacité de l'épithélium à contrôler l'absorption des molécules dans l'organisme est appelée « fonction barrière ». La structure complexe

de la barrière intestinale constitue une ligne de défense à la fois immunologique, physiologique et physique.

De façon intéressante, de nombreuses études suggèrent que, dans les cas d'obésité et de diabète de type 2, une augmentation transitoire de la perméabilité intestinale pourrait favoriser le passage d'endotoxines bactériennes dans la circulation systémique et le développement d'une inflammation de bas grade, caractéristique de ces maladies métaboliques. L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'insuline, en agissant spécifiquement au niveau des cellules épithéliales de l'intestin, contribue au maintien des fonctions intestinales et de l'homéostasie glycémique. Nous chercherons notamment à déterminer si une résistance intestinale à l'action de l'insuline pourrait constituer un événement précoce de l'augmentation de la perméabilité au cours du diabète et de l'obésité. Pour étudier les relations entre perméabilité intestinale et inflammation, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement in vitro.

Dans ce projet, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour développer une obésité, ces souris seront nourries avec un régime hyperlipidique et nous analyserons l'impact sur la perméabilité intestinale et les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs. Des modèles de colites et d'inflammation systémique seront utilisés pour analyser le contrôle de la perméabilité intestinale dans un contexte inflammatoire.

Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Toutes les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie générale. Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 540. Concrètement, les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, tout au long de cette étude, nous réévaluerons la possibilité de faire appel à des méthodes alternatives et des modèles in vitro afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions intestinales par l'insuline. Ils pourraient renforcer ou infirmer l'idée selon laquelle l'utilisation de thérapeutiques agissant sur le récepteur intestinal à l'insuline pourrait avoir un effet bénéfique chez des patients diabétiques

**9581** L'objet de cette demande d'autorisation de projet est d'utiliser en élevage une lignée de souris modèle d'une maladie neurodégénérative, afin d'étudier un phénotype dommageable de ces animaux. Ce projet se situe dans le cadre de la recherche fondamentale en santé.

La maladie en question est une maladie héréditaire dégénérative rare affectant principalement le système nerveux, tels que le cervelet et la rétine. Des troubles à la marche et une perte d'acuité visuelle se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. La maladie est causée par une mutation dans une protéine, qui s'accumule au niveau intracellulaire et devient toxique pour les neurones au court du temps. Les mécanismes de neurotoxicité sont en grande partie mal compris aujourd'hui. L'élucidation de ces mécanismes requiert l'utilisation de bons modèles en laboratoire.

Pour étudier la pathophysiologie de cette maladie, nous avons obtenu un modèle de souris génétiquement modifiées, qui présente les caractéristiques principales de la maladie. La grande similarité entre ce modèle de souris et la pathologie humaine en fait un modèle idéal pour tester des hypothèses scientifiques permettant de mieux comprendre la maladie et son évolution, et pour tester des stratégies thérapeutiques pour soigner la maladie, ce qui rend le REMPLACEMENT par une méthode alternative inutile à notre stade.

Des études antérieures sur cette maladie nous permettent de RAFFINER notre programme d'étude et ainsi REDUIRE le nombre des animaux expérimentaux. D'abord, dans le but initialement de REMPLACER l'utilisation des souris, nous avons déterminé la fonction de la protéine au cours du développement du système nerveux chez le poisson-zèbre. Ensuite, une étude antérieure de ces

souris montre que leur survie est limitée à 1 an à l'état hétérozygote et 7 mois chez l'homozygotes. Dans le but de RAFFINER l'expérimentation et d'éviter toute souffrance inutile, des points critiques de souffrance ont déjà été établis par l'observation de la perte de poids plusieurs semaines avant leur décès. D'autres points critiques seront néanmoins recherchés dans le futur par soucis de RAFFINEMENT.

L'élevage de ces souris nous permettra d'envisager deux catégories d'expériences. Premièrement, nous chercherons à identifier les étapes précoces de la maladie au niveau moléculaire et cellulaire en prélevant des tissus chez de jeunes souris euthanasiées. Deuxièmement, nous voulons mieux décrire les paramètres phénotypiques (principalement moteur), ceci afin de mieux comprendre la maladie, mais aussi identifier les paramètres les plus aptes à être utilisés comme référence lors d'essais thérapeutiques à venir. 895 souris sur une période de 5 ans suffiront pour nos projets, à la fois pour l'élevage des animaux ainsi que pour les procédures expérimentales.

En conclusion, nos projets visent à utiliser un modèle souris au phénotype dommage, qui présente les symptômes d'une pathologie humaine, dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents et, plus tard de développer des stratégies thérapeutiques pour soigner les patients.

**9582** La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), également appelée colite ulcéreuse, sont des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Ces maladies évoluent par poussées entrecoupées de périodes de rémission. Elles ont pour origine une part génétique et une part environnementale, dont la conséquence est l'apparition d'un trouble de la régulation de la réponse immunitaire contre les éléments de la flore intestinale. La MC peut toucher l'ensemble du tube digestif alors que la RCH est limitée au colon. Ces maladies sont relativement fréquentes dans les pays industrialisés comme en Europe, aux USA et au Canada. Elles peuvent toucher jusqu'à 300 personnes pour 100 000 habitants. Leur prise en charge est un enjeu majeur de santé publique. A l'échelle tissulaire, il existe une atteinte inflammatoire de la paroi du tube digestif plus ou moins profonde en fonction du type de maladie. Le maintien de l'inflammation conduit à une production excessive de matrice extracellulaire appelée fibrose. Cette fibrose est une cicatrisation pathologique qui rigidifie le tissu pouvant ainsi le rendre non fonctionnel et engendrer de multiples complications. L'atteinte grélique dans la maladie de Crohn touche environ un patient sur trois. Elle se manifeste le plus souvent par la survenue d'ulcérations de la muqueuse, c'est-à-dire une perte de substance mettant à nue les couches profondes de la paroi digestive. Ces ulcérations sont responsables de troubles digestifs variés allant de douleurs abdominales jusqu'à la perforation de la paroi grélique. Une autre complication fréquente est la survenue de fistule. Les fistules correspondent au développement anormal d'un trajet inflammatoire entre la lumière d'un organe digestif et une cavité ou la peau, livrant passage à des liquides physiologiques. Ces complications mutilantes sont associées au développement d'un tissu fibrotique important. Elles touchent environ 30% des patients dans les deux premières décennies suivant le diagnostic et entraîne une dégradation majeure de la qualité de vie. L'efficacité des traitements actuels (médicaux, non invasifs et chirurgicaux) reste insuffisante.

Ce projet a pour but d'étudier le rôle des cellules stromales, qui sont une source importante de matrice extracellulaire et de facteurs pro-inflammatoires, dans le remodelage du tissu digestif et de ses pathologies associées (inflammation, fibrose). A moyen terme, ce projet vise à identifier des nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique a été modifié afin de visualiser et d'étudier au niveau moléculaire les cellules stromales. La complexité du développement des pathologies inflammatoires ne permet pas, à ce jour, une approche expérimentale de remplacement in vitro. La souris est un bon modèle pour étudier ces questions car de nombreux outils existent et permettent d'étudier en détail les mécanismes biologiques. Le nombre de souris nécessaires à ce projet a été réduit au maximum. Pour les quatre procédures qui seront mises en œuvre dans ce projet, nous estimons à 3300 (sur 5 ans), le nombre de souris nécessaires, en nous limitant aux seules expériences et répétitions indispensables pour atteindre des résultats significatifs. Nous utiliserons des souris mâles et femelles adultes. Tout au long du projet, nous donnerons la préférence aux procédures non invasives lorsque c'est possible et nous aurons recours aux soins/analgsies nécessaires pour limiter la douleur et l'inconfort. Les niveaux de sévérité

attendus liés à nos procédures sont de léger à modéré, cependant toutes les précautions seront prises pour limiter toute souffrance et inconfort potentiel. Pour nous en assurer, un suivi régulier multidisciplinaire sera assuré : journalier par l'équipe de recherche et l'équipe animalière, hebdomadaire par l'équipe vétérinaire.

**9583** Face aux problématiques qu'impliquent les perturbateurs endocriniens, différentes études sont nécessaires pour vérifier l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine. Ces études combinent des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*). Caractériser l'effet d'un composé chimique sur les concentrations hormonales circulantes reste essentiel dans le processus d'évaluation toxicologique et nécessite des études animales. Toutefois, mesurer des concentrations hormonales circulantes de façon précise, sensible et reproductible n'est pas aisé. En effet, outre les aspects analytiques, la mesure de concentrations hormonales implique également de maîtriser un grand nombre de facteurs susceptibles d'influencer directement les niveaux hormonaux chez les animaux (site de prélèvement de sang, temps de prélèvement pour prendre en compte le cycle circadien, âge des animaux...). En accord avec le principe des 3Rs, il est nécessaire de réaliser des études apportant la preuve que le processus complet de mesure des concentrations hormonales permet effectivement de mettre en évidence les modulations attendues avec des composés de référence.

Dans ce contexte, le projet prévoit plusieurs études animales (rat) permettant de mener une validation scientifique des mesures d'hormones de différents systèmes endocriniens (thyroïdien, gonadotrope, corticotrope...). Les effets et le degré de sensibilité aux perturbateurs endocriniens pouvant varier en fonction de la période d'exposition, le projet prévoit d'étudier les effets à différents stades : fœtal, néonatal, adulte. De plus, les études seront réalisées sur les deux sexes puisque les effets peuvent varier chez le mâle et la femelle.

Les rats seront exposés chroniquement par gavage oral avec des perturbateurs endocriniens de référence. Des prélèvements répétés de sang seront réalisés au cours de la période de traitement pour évaluer la cinétique d'apparition des effets sur les concentrations hormonales plasmatiques.

Toutes ces études se feront dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 1500 rats pourra être utilisé sur 5 années pour ce projet (15 animaux par groupe X 4 composés X 2 doses en moyenne X 2 sexes X 3 fonctions endocriniennes X 2 (pour les études adultes ou les études fœtales/néonatales). Les animaux seront hébergés par groupe ou individuellement si nécessaire avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux seront observés tous les jours (week-ends compris). Des points limites ont été définis par le laboratoire, conditionnant l'appel à un vétérinaire du site. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal sera réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

**9584** Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD) sont caractérisées par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans le foie dans plus de 5% des cellules hépatiques, en absence de toute consommation d'alcool ou d'hépatite liée à une infection virale ou une maladie auto-immune. Elles sont, dans la majorité des cas, considérées comme des maladies bénignes du foie. Si la prévalence des NAFLD est de 25% dans la population mondiale, certains patients (10-40% des personnes atteintes de NAFLD) développent une manifestation plus sévère de la stéatose : la stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) qui se caractérise alors par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, un ballonnement hépatocytaire et une inflammation pouvant aboutir à une fibrose. Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose non alcoolique voire un hépato-carcinome. La mortalité chez ces patients atteints de NASH est d'environ 7% dans la population générale et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et d'activité physique sont utilisées pour réduire l'impact des NAFLD/NASH et il n'existe aucun traitement thérapeutique sur le marché dans cette indication précise.

L'objectif de ce projet est d'utiliser le poisson zèbre (*Danio rerio*) pour sélectionner des candidats médicaments dans le traitement des NAFLD/NASH. La recherche de nouveaux médicaments repose sur une première étape d'identification de molécules efficaces sur leur cible au moyen de tests in

in vitro. L'efficacité thérapeutique d'une molécule ne peut être démontrée qu'après évaluation dans un organisme complexe vivant. Les molécules sélectionnées in vitro doivent ainsi être ensuite administrées in vivo. Les modèles de poisson zèbre se situent à l'interface des modèles cellulaires ou invertébrés (ex vers nématode *C. Elegans* ou mouche du vinaigre *D. Melanogaster*) et des modèles vertébrés plus évolués (rongeurs, primates). Ils constituent un bon compromis entre nos besoins pour les premières étapes de sélection in vivo et la nécessité de disposer d'un système in vivo à la physiologie la plus proche possible de celle de l'homme. Le poisson zèbre présente les avantages d'être de petite taille, à forte fécondité, au développement très rapide (maturité sexuelle à 2 et 3 mois). La transparence des alevins facilite les approches d'imagerie non invasive, et leur perméabilité aux petites molécules permet une administration facile de traitements. Le génome du poisson zèbre est complètement séquencé et présente une forte homologie avec celui de l'homme (équivalence à 71% des gènes humains). L'homologie physiologique avec les mammifères est également élevée, avec notamment le foie dans lequel on retrouve les différents types cellulaires anatomiquement et fonctionnellement similaires dès 4 jours post-fécondation.

Des modèles de NAFLD/NASH, permettant de reproduire certains aspects physiopathologiques des NAFLD et/ou NASH sont disponibles chez le poisson zèbre et peuvent être :

- induits par différents régimes nutritionnels hypercaloriques (durée, âge des poissons au début du régime et composition variables)

- issus de modifications génétiques (lignées spontanément mutantes ou modifiées génétiquement pour les gènes impliqués dans la pathologie) ou obtenus en administrant aux alevins des molécules modifiant le fonctionnement du foie (ajoutées à l'eau du bac ou à la nourriture).

Les études sur ces modèles consistent alors à :

- caractériser le degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan morphologique via des techniques d'imageries non invasives sur alevins anesthésiés, et histologique, biochimique ou biologique après euthanasie.

- évaluer la capacité de produits de référence et de candidats médicaments à réduire ou ralentir l'apparition des signes liés à stéato-hépatite. Les produits seront directement ajoutés à l'eau des alevins en continu sur plusieurs jours.

Les modèles poisson zèbre se justifient en regard de l'application de la règle des 3R :

- Au niveau inter-espèce en permettant de réduire le nombre d'animaux vertébrés supérieurs (rongeurs) qu'il faudrait utiliser pour atteindre les mêmes objectifs. In fine, le poisson zèbre pourrait remplacer le rongeur dans certaines études.

- Au sein même de l'espèce : la larve peut remplacer le juvénile et l'adulte dans certaines études. Par définition, les larves n'ont pas besoin d'apport alimentaire extérieur (jusqu'à 5 jpf) et ne rentrent pas dans le scope de la directive 2010/63/EU. A 4 et 5 jpf, le foie étant formé, il est théoriquement possible d'étudier les conséquences de modifications génétiques. Les modèles induits par régime alimentaire ne pourront débuter qu'à 5 jpf seront encadrés par ce projet. L'âge maximum des poissons dépendra de la durée des régimes alimentaires et ne dépassera pas 2 mois.

Lorsque suffisamment de données seront réunies, les études feront l'objet de consultations statistiques pour réajuster si besoin le nombre d'animaux nécessaire. Dans certains cas, il est possible de combiner deux procédures expérimentales sur un même poisson, ce qui divise ainsi le nombre total d'animaux utilisés par deux.

Des artémies (petits crustacés) sont apportés en complément du régime alimentaire afin d'enrichir l'environnement des poissons en favorisant leur comportement de chasse. Tous les poissons sont maintenus dans des bacs communautaires, répondant à leur instinct grégaire.

Tous les poissons de ce projet font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permet d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites définis. Il sera accru pour les lignées de poissons génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable.

Le nombre de poissons de plus de 5 jpf prévu par étude est d'une centaine et on suppose pouvoir réaliser une cinquantaine d'études par an. Ainsi, sur la durée du projet prévue pour 5 ans, environ 25000 poissons seront utilisés, la moitié pour la mise au point des modèles, l'autre pour la phase de validation pharmacologique.

Le projet est de degré de gravité modéré, pour un objectif thérapeutique important chez l'homme.

Les stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD) sont les maladies hépatiques les plus fréquentes dans les pays industrialisés, associées à l'obésité et au diabète de type 2. La stéatose se caractérise par une accumulation de graisses dans les cellules du foie (les hépatocytes). Bien que souvent asymptomatique, cette accumulation peut entraîner une réponse inflammatoire appelée stéato-hépatite non alcoolique (NASH) qui favorise l'apparition d'une cirrhose et dans certains cas le développement d'un cancer du foie (hépatocarcinome ou CHC). La présence de stéatose est rapportée sur environ 20 à 30% des biopsies hépatiques réalisées dans la population générale, et celles de la NASH dans 2 à 3 %. La définition correspond à des lésions, comparables à celles objectivées lors des intoxications alcooliques chroniques, en l'absence de prise significative d'alcool (> 20 à 30 g/j chez l'homme, > 20 g/j chez la femme), ou d'association à d'autres maladies hépatiques chroniques (virales ou toxiques). Les lésions de stéatose sont classiquement notées chez la majorité des malades obèses (60 à 75%), diabétiques (21 à 78%) et avec un taux élevé de lipides dans le sang (50 %). Les lésions de NASH sont objectivées chez environ 20% des malades obèses. Cependant les lésions de NASH peuvent également être notées chez des malades sans surpoids (3%), ni diabète patent. Ces lésions vont de la simple stéatose qui possède une évolution bénigne, à des lésions de stéato-hépatites dites évolutives et qui sont responsables de l'apparition d'une fibrose hépatique et de véritable cirrhose pouvant se compliquer en cancer du foie. La NASH n'est pas le résultat d'une lésion en particulier, mais plutôt la « co-existence » de plusieurs lésions incluant une stéatose, une dégénérescence des cellules du foie et des infiltrations de cellules inflammatoires dans le foie. Les mécanismes conduisant au développement de la NASH n'ont, à ce jour, pas été formellement élucidés et l'hypothèse d'une pathologie multifactorielle reste la plus probable. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la NASH est devenue un enjeu majeur de santé publique. Il a été montré que l'augmentation de l'expression du récepteur TREM-1 au niveau des cellules inflammatoires dans le foie était corrélée à la sévérité de l'inflammation de la NASH et par conséquent, son inhibition pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Ce travail fait suite à un projet démarré en 2018 et pour lequel nous avons obtenu des résultats encourageants qui montrent effectivement que le peptide antagoniste de TREM réduit significativement la fibrose, consécutive à l'apparition de la NASH elle-même induite par un régime alimentaire spécifique. Cependant, durant la réalisation du protocole, les souris ont subi une perte de poids importante à cause d'un problème de liquéfaction des aliments. Ce problème a été résolu en modifiant les conditions d'élevage des animaux. Pour valider nos résultats précédents et exclure les biais résultants du problème de la nourriture, nous souhaitons répéter le même protocole en modifiant les conditions d'alimentation des souris et ainsi réaliser les mêmes analyses.

Dans cette étude, nous voulons donc évaluer le potentiel thérapeutique d'un peptide inhibiteur de TREM-1 pour le traitement de la NASH chez la souris. Pour cela, nous souhaitons utiliser un organisme vivant pour tester le(s) effet(s) du peptide sur les différents symptômes que représente la NASH. A ce jour, la souris reste le meilleur modèle représentatif de la NASH rencontré chez l'homme et ainsi les résultats de cette étude pourraient représenter les premiers éléments du développement d'une nouvelle thérapie pour la NASH chez les patients.

1. Remplacement : Il n'existe aucune approche in vitro qui pourrait nous permettre d'étudier le rôle de TREM-1 dans le développement d'une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle comme la NASH. Une étude chez un organisme vivant est indispensable pour mettre en évidence l'effet de l'inhibition de TREM-1 sur l'ensemble des paramètres (système immunitaire, microbiote intestinal, etc...) contribuant au développement de la NASH et évaluer réellement le potentiel thérapeutique du peptide.

2. Réduction : l'étude sera réalisée avec un nombre total de 104 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Chaque groupe comportera 8 animaux : un nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, au vu des analyses qui seront conduites à partir de ces animaux.

3. Raffinement : Dès leur réception, les animaux auront une période d'acclimatation d'une semaine pour s'adapter à leur nouvel environnement. Ils seront hébergés dans une animalerie dotée de tous les paramètres nécessaires (température, hygrométrie, filtration de l'air, ...) à leur bien-être. La pathologie (NASH) sera induite par l'administration d'un régime alimentaire carencé en méthionine et choline durant 6 semaines. Cette méthodologie est fréquemment utilisée pour induire une NASH

expérimentale représentative de celle observée chez l'homme. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide durant 2 semaines par un personnel technique qualifié. Le peptide utilisé a déjà montré ses effets bénéfiques dans le traitement d'autres pathologies comme le choc septique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera fixé à 20% de perte du poids corporel avec identification des signes de mal-être définis au préalable par notre vétérinaire référent. En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des prélèvements d'organes seront effectués pour permettre de réaliser les analyses biochimiques.

**9586** Dans certains cas de cancers du poumon ou du foie, des patients sont inopérables et l'accès aux tumeurs et aux métastases les plus petites nécessitent la mise en œuvre de techniques chirurgicales micro-invasives couplées à des méthodes de guidage et d'imagerie à la pointe du progrès médical. La localisation, l'atteinte et le traitement de tumeurs profondes de l'arbre bronchique sont un enjeu clinique majeur lors d'interventions mini invasives. Malgré les avancées technologiques en imagerie médicale, à peine 30 % des nodules pulmonaires cancéreux sont diagnostiqués lorsqu'ils se trouvent hors de portée d'une bronchoscope standard. La bronchoscopie seule ne permet en effet pas d'atteindre les plus petites bronches du fait du large diamètre de l'outil.

Des approches mixtes utilisant une sonde échographique couplée au bronchoscope ont déjà été développées mais n'améliorent pas toujours l'accès aux tumeurs plus périphériques et ne permettent pas de situer la tumeur sur le scanner préopératoire, modalité d'imagerie classiquement utilisée dans le cas de cancers du poumon.

Le guidage électromagnétique (EMT) serait alors indiqué pour localiser en temps réel les tumeurs des plus petites bronches tout en permettant la réalisation d'images préopératoires.

L'ablation guidée par l'imagerie, échographie ou fluoroscopie peropératoires, représente à l'heure actuelle une bonne alternative à la résection chirurgicale pour les patients inopérables. Toutefois le guidage électromagnétique couplé au scanner initial du patient semble plus efficace que les ultrasons seuls pour la détection des lésions et, tout en étant plus précis et efficient, il permet de s'affranchir des radiations propres à la fluoroscopie. De plus, l'intérêt du guidage électromagnétique versus les ultrasons pour détruire les métastases hépatiques par électrolocation (décharges électriques) reste à être démontré.

De même, dans les cas de cancer du foie inopérables, les traitements alternatifs vont impliquer diverses approches couplant des technologies d'imagerie et guidage percutané.

Ce projet a pour but d'étudier la pertinence et la faisabilité du guidage électromagnétique (EMT) comme outil en chirurgie faiblement invasive pour deux applications cliniques :

- i) le guidage endoscopique par les voies aériennes et,
- ii) le guidage percutané d'une aiguille dans le foie.

La nature non ionisante de la technologie électromagnétique permettrait de réduire les radiations pendant l'intervention.

L'intérêt de l'EMT en électroporation sera également étudié en parallèle, il s'agit du rôle possiblement plus pertinent du guidage électromagnétique d'une aiguille percutanée, par rapport aux ultrasons ou des rayons X, pour détruire par des décharges électriques répétées des tumeurs ou métastases hépatiques inopérables.

Cette étude préclinique sera conduite sur modèle porc pour évaluer la faisabilité technique et la sécurité de l'atteinte des cibles prédéfinies à la fois dans le foie et les poumons, tout en utilisant des moyens de chirurgie mini-invasive, avec très peu ou pas de radiations.

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

Remplacement : Le recours à l'animal est nécessaire pour évaluer l'efficacité de l'utilisation du guidage électromagnétique dans la détection et le traitement des tumeurs dans le foie et les poumons, afin de pouvoir envisager par la suite la mise en place d'essais cliniques chez l'homme.

Réduction : Selon notre expérience, nous avons estimé qu'un effectif réduit à 6 animaux permettra d'atteindre les objectifs scientifiques souhaités. Plusieurs procédures (foie et poumon) seront menées sur un même animal.



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

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

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

**9587** D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, dans les pays à faible revenu, près de 4 décès sur 10 touchent des enfants de moins de 15 ans, et 2 décès sur 10 seulement des personnes âgées de 70 ans ou plus. Ce sont les maladies infectieuses qui provoquent le plus de décès : infections des voies respiratoires inférieures, VIH/SIDA, maladies diarrhéiques, paludisme et tuberculose sont responsables à eux tous de près du tiers des décès dans ces pays. La lutte contre les maladies infectieuses passe, entre autres, par la protection vaccinale des populations menacées. Il existe actuellement un grand nombre de vaccins disponibles pour lutter contre des maladies épidémiques comme Diphtérie, les Oreillons, la Rougeole, et récemment la Dengue. Tout vaccin peut être amélioré, pour augmenter son pouvoir de protection, ou la durée de protection. Il existe, d'autre part, un grand nombre de maladies pour lesquelles la recherche continue à œuvrer pour découvrir un vaccin, comme le VIH/SIDA, ou des cancers connus pour être viro-induits. Le développement de vaccins consiste en la sélection d'un antigène permettant de stimuler une réponse immunitaire adaptée par l'organisme. Eventuellement, un adjuvant rend cette stimulation plus efficace. Après des phases initiales in silico (par ordinateur) et in vitro (tests cellulaires), il est indispensable de tester les candidats vaccins sur un organisme vivant, parce que le fonctionnement du système immunitaire est très complexe et fait appel à des mécanismes qu'il n'est pas possible de reproduire autrement. Nous choisissons des modèles animaux adaptés à chaque maladie contre laquelle nous voulons lutter. Nous développons en parallèle des méthodes de suivi de la réponse immunitaire chez ce modèle animal pour pouvoir extrapoler les résultats chez l'Homme.

Notre projet consiste donc à l'utilisation d'animaux vivants pour tester d'une part l'immunogénicité de candidats vaccins, puis, si les résultats sont satisfaisants, l'efficacité de ces candidats, en vaccinant des animaux qui sont ensuite soumis à une infection. Si les animaux ne développent pas l'infection, le vaccin est considéré comme efficace et il est ensuite testé chez l'Homme ou l'espèce animale qu'il doit protéger (vaccin vétérinaire). En général, les essais d'immunogénicité ne provoquent pas d'effets néfastes graves, toutefois, tous ces signes sont suivis avec attention pour détecter tout signe d'irritation. Pour les essais d'infection, les animaux peuvent développer des signes cliniques de l'infection, qui sont suivis, soignés, et si ce n'est pas possible, les animaux seront euthanasiés. Pour ces travaux de développement vaccinal, nous utiliserons, sur 5 ans, au maximum, le nombre d'animaux suivant : 2000 souris (100 souris tous les 3 mois pendant 5 ans), 1000 rats, 500 cobayes, 500 hamsters, 500 gerbilles, 1000 volailles, 1000 lapins, 100 chiens, 100 furets, 200 porcs, 100 ovins, 100 caprins. Ce nombre dépend du nombre de tests demandés par les programmes de développement de vaccins. Pour chaque test, le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats interprétables sera utilisé. L'espèce animale choisie est celle chez laquelle il est possible de reproduire la maladie contre laquelle on travaille. Si plusieurs espèces sont possibles, nous choisissons l'espèce la moins sensible à la détention en laboratoire. Toutes les compétences sont mises en œuvre pour limiter la souffrance des animaux au cours de ces tests. Ils sont, en routine, hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques, la plupart du temps en groupes sociaux harmonieux, dans des cages équipées d'enrichissements du milieu, tout en tenant compte des contraintes de biosécurité du laboratoire.

**9588** Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un facteur clé dans la pathogenèse de maladies chroniques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Le microbiote module les systèmes biologiques de l'hôte qui contribuent au contrôle de l'homéostasie énergétique, du métabolisme du glucose et de l'inflammation en agissant principalement sur la fonction barrière de l'intestin. Il joue un rôle clé dans le développement de l'inflammation de faible intensité caractéristique de ces maladies

métaboliques. De nombreuses études ont montré que la fonction barrière de l'intestin était altérée en cas d'obésité et pourrait favoriser le développement du phénomène inflammatoire. Notre projet vise à identifier et caractériser de nouveaux acteurs permettant de moduler directement la perméabilité intestinale et l'inflammation dans un contexte physiopathologique. Pour étudier les relations entre perméabilité intestinale et inflammation, seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement de l'obésité, est envisageable et ne peut être substituée par des analyses réalisées uniquement *in vitro*. Dans ce projet, nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Le nombre de souris utilisées sera de 960. Les animaux seront hébergés en groupe avec leurs congénères dans un milieu enrichi. Pour développer une obésité, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique et nous analyserons l'impact sur la composition corporelle par une méthode non-invasive, la perméabilité intestinale et les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels de tolérance au glucose. L'analyse de la sensibilité à l'insuline sera réalisée sous anesthésie profonde pour que l'animal ne souffre pas. Des modèles de colites et d'inflammation systémique seront utilisés pour analyser le contrôle de la perméabilité intestinale dans un contexte inflammatoire. Notre projet met en jeu l'administration de substances pharmacologiques pour valider *in vivo* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études *in vitro*. Des méthodes alternatives de culture cellulaire seront utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter l'obésité et ses complications.

**9589** La drépanocytose est une maladie héréditaire affectant les globules rouges. Les patients souffrent de crises douloureuses à la suite de l'obstruction de vaisseaux sanguins. Le fonctionnement des vaisseaux est également perturbé, aboutissant à des complications vasculaires. La pathologie rend aussi les globules rouges fragiles menant les patients à une anémie chronique. Récemment, un processus appelé éryptose ou mort par suicide du globule rouge a été suggéré comme pouvant participer à ces anomalies. Celui-ci pourrait être accru en cas d'un stress oxydant ou d'une inflammation exacerbée, phénomènes majeurs chez les patients drépanocytaires. L'éryptose s'accompagne de l'émission de petites vésicules du globule rouge appelées microparticules (MPs). Ces éléments pourraient avoir des effets néfastes sur les vaisseaux et la coagulation. Pour autant, le rôle de ces processus et les mécanismes associés conduisant aux perturbations observées sont méconnus.

Par ailleurs, l'activité physique est reconnue chez l'individu sain mais également atteint de maladies cardiovasculaires comme pouvant limiter l'inflammation et le stress oxydant et donc potentiellement endiguer l'éryptose, réduisant les conséquences cliniques de ces altérations.

L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle de l'éryptose et des MPs érythrocytaires dans les anomalies vasculaires, l'anémie chronique et les déséquilibres de la balance thrombose/hémostase rencontrés dans la drépanocytose. L'étude permettra en outre de mettre en évidence le rôle potentiellement bénéfique de l'activité physique en tant que contre-mesure face aux mécanismes aboutissant à la mort des globules rouges et à l'émission de ces MPs.

Des modèles murins transgéniques drépanocytaires seront injectés avec des MPs érythrocytaires isolées chez le patient et l'individu sain et les répercussions de ces MPs sur les fonctions vasculaires *in vivo* et *ex vivo* seront analysées. En outre, des souris drépanocytaires réaliseront un protocole d'entraînement volontaire et les conséquences de celui-ci sur le phénomène d'éryptose, la libération de MPs érythrocytaires, la fonction vasculaire des animaux et la formation des caillots sanguins seront étudiées.

Les résultats issus de ces protocoles permettront de développer les connaissances scientifiques sur la physiopathologie de la maladie et pourront ainsi potentiellement mener à l'élaboration de traitements visant à limiter les complications vasculaires, l'anémie et les troubles de la coagulation.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet. En effet, la drépanocytose est une maladie systémique multi-organes ; l'objectif principal de l'étude étant de mesurer le fonctionnement des vaisseaux et d'évaluer des marqueurs sanguins, une approche intégrée est donc indispensable.

Les démarches mises en œuvre pour suivre la règle des 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Ce projet concernera 436 souris.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Les signes associés à la douleur seront particulièrement surveillés notamment la prostration, l'immobilité et la chute de pelage. Des anesthésiques sont utilisés pendant les expérimentations et les souris seront placées en couveuse chauffée (37 degrés) pour assurer un confort thermique et réduire ainsi le stress.

**9590** Depuis 2004, les cancers représentent la première cause de mortalité en France devant les maladies cardio-vasculaires. En 2017, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine a été estimé par l'Institut National contre le Cancer à 399 500 et le nombre de décès à 150 000. Parmi les nombreux mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression des tumeurs solides, la communication directe des cellules cancéreuses avec les cellules adjacentes a retenu l'attention des chercheurs depuis les années 1980. En effet, la rupture du dialogue avec les cellules saines contigües correspond à l'un des 1ers stades du développement cancéreux. Cependant, les travaux plus récents démontrent que ce type de communication intercellulaire (et les protéines qui en sont responsables, les connexines) jouerait un rôle plus complexe avec un effet pro-tumoral lors de la dissémination dans le reste de l'organisme. En effet, la possibilité de communication des cellules tumorales avec les cellules des vaisseaux ou de sites métastatiques secondaires augmenterait la propagation des cellules cancéreuses et l'expression de connexines (notamment la Cx43) engendrerait un effet clairement pro-tumoral.

L'objectif de la présente étude consiste à tester in vivo les mécanismes moléculaires impliquant la Cx43 dans la croissance tumorale et la progression vers des atteintes métastatiques. En effet, déjà démontrés in vitro par l'utilisation de cellules tumorales prostatiques humaines génétiquement modifiées pour exprimer certaines parties de la Cx43, il convient donc de transposer ces résultats in vivo sur des tumeurs implantées chez la souris Nude avant d'envisager une stratégie anti-métastatique. Pour mener à bien ce projet, nous souhaitons mettre en place 4 protocoles expérimentaux différents sur des souris athymiques correspondant chacun à un site d'implantation et donc à un microenvironnement différent pouvant influencer le phénotype et l'agressivité des cellules cancéreuses de la prostate (sous-cutané, prostatique, osseux et sanguin).

Un total de 176 souris athymiques NUDE sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. Les données recueillies lors de précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales, notamment pour la définition de points de contrôle et limites (comportementaux et physiques), pour l'utilisation des antalgiques et pour les actes chirurgicaux.

Selon la « Règle des 3 R » compte tenu des avancées de nos travaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro pour étudier la progression tumorale et la dissémination métastatique dans l'organisme entier (remplacer). Par une approche statistique (Snedecor et Cochran), la réduction au maximum du nombre d'animaux nécessaires en expérimentation a été prise en compte, tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour conduire une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 5 souris, nid, jouets etc.) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). De plus, les conditions d'expérimentations ont été raffinées afin d'assurer les bonnes conditions de réalisation des protocoles et l'absence de souffrance animale (utilisation d'une prémédication antalgique et d'un contrôle échographique).

**9591** L'objet de cette demande d'autorisation de projet est d'utiliser en élevage une lignée de souris modèle d'une maladie neurodégénérative, afin d'étudier un phénotype dommageable de ces animaux. Ce projet se situe dans le cadre de la recherche fondamentale en santé.

La maladie en question est une maladie héréditaire dégénérative rare affectant principalement le système nerveux, tels que le cervelet et la rétine. Des troubles à la marche et une perte d'acuité visuelle se développent à l'âge adulte et progressent inexorablement vers une issue fatale pour les patients. La maladie est causée par une mutation dans une protéine, qui s'accumule au niveau intracellulaire et devient toxique pour les neurones au court du temps. Les mécanismes de neurotoxicité sont en grande partie mal compris aujourd'hui. L'élucidation de ces mécanismes requiert l'utilisation de bons modèles en laboratoire.

Pour étudier la pathophysiologie de cette maladie, nous avons obtenu un modèle de souris génétiquement modifiées, qui présente les caractéristiques principales de la maladie. La grande similarité entre ce modèle de souris et la pathologie humaine en fait un modèle idéal pour tester des hypothèses scientifiques permettant de mieux comprendre la maladie et son évolution, et pour tester des stratégies thérapeutiques pour soigner la maladie, ce qui rend le REMPLACEMENT par une méthode alternative inutile à notre stade.

Des études antérieures sur cette maladie nous permettent de RAFFINER notre programme d'étude et ainsi REDUIRE le nombre des animaux expérimentaux. D'abord, dans le but initialement de REMPLACER l'utilisation des souris, nous avons déterminé la fonction de la protéine au cours du développement du système nerveux chez le poisson-zèbre. Ensuite, une étude antérieure de ces souris montre que leur survie est limitée à 1 an à l'état hétérozygote et 7 mois chez l'homozygotes. Dans le but de RAFFINER l'expérimentation et d'éviter toute souffrance inutile, des points limites ont déjà été établis par l'observation de la perte de poids plusieurs semaines avant leur décès. D'autres points limites seront néanmoins recherchés dans le futur par soucis de RAFFINEMENT.

L'élevage de ces souris nous permettra d'envisager deux catégories d'expériences. Premièrement, nous chercherons à identifier les étapes précoces de la maladie au niveau moléculaire et cellulaire en prélevant des tissus chez de jeunes souris euthanasiées. Deuxièmement, nous voulons mieux décrire les paramètres phénotypiques (principalement moteur), ceci afin de mieux comprendre la maladie, mais aussi identifier les paramètres les plus aptes à être utilisés comme référence lors d'essais thérapeutiques à venir. 700 souris sur une période de 5 ans suffiront pour nos projets, à la fois pour l'élevage des animaux ainsi que pour les procédures expérimentales.

En conclusion, nos projets visent à utiliser un modèle souris au phénotype dommage, qui présente les symptômes d'une pathologie humaine, dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents et, plus tard de développer des stratégies thérapeutiques pour soigner les patients.

**9592** L'os est le deuxième tissu le plus transplanté après le sang, avec plus de 2,2 millions de greffes osseuses réalisées chaque année dans le monde. Les greffes osseuses sont généralement récoltées chez le patient, mais les complications associées au prélèvement du greffon osseux, ainsi que la faible quantité et/ou qualité de l'os récolté chez les patients âgés, pédiatriques ou cancéreux, constituent des limites sérieuses pour cette technique. Les produits d'ingénierie tissulaire osseuse, qui combinent un matériau support poreux et des cellules capables de produire du tissu osseux, représentent un traitement alternatif aux greffes osseuses. Il est déjà bien établi dans la littérature que l'architecture du matériau support contrôle, au moins en partie, la capacité de réparation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse.

L'objectif de ce projet est d'utiliser de nouveaux procédés d'impression 3D pour optimiser l'architecture du matériau support et améliorer la capacité de réparation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse. Pour cela, nous utiliserons un modèle de défaut osseux fémoral chez le rat. Il s'agit d'une technique d'évaluation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse reconnue et validée dans la littérature. Pour la réalisation ce projet, des implants en céramique ayant des formes de pores différentes serontensemencés de cellules souches capables de former de l'os et implantés dans les défauts fémoraux. La procédure chirurgicale ainsi que le suivi par imagerie de la viabilité des cellules implantées et de la formation osseuse dans les implants ont déjà été évalués et approuvés. Afin de mieux évaluer la récupération fonctionnelle des animaux après implantation, et d'en déduire des potentiels facteurs de variations quant aux résultats obtenus, nous souhaiterions compléter l'étude

avec une analyse de la locomotion en cinéroradiographie (imagerie rayon X de l'animal en mouvement), d'où la soumission de ce projet. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale et appliquée qui vise à élargir les connaissances afin de développer une alternative à la greffe osseuse chez l'homme. Il permettra de mieux comprendre l'impact de l'architecture du matériau support sur le potentiel de réparation osseuse des produits d'ingénierie tissulaire osseuse.

4 formes de pores seront testées (8 rats/groupes), soit 32 rats. Remplacement : Il n'existe pas de modèle ex vivo permettant de reproduire la complexité de l'environnement in vivo impliqué dans réparation osseuse. Réduction : Une technique d'imagerie non invasive (rayon X) sera utilisée pour suivre la récupération fonctionnelle sur le même animal. Les animaux ne seront mis à mort qu'aux temps terminaux de l'étude. Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions permettant un enrichissement social et l'expression de comportement de fouissage, de nidification et de rongement. La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Une évaluation scorée du bien-être des animaux, sur laquelle seront basés les points limites, sera mis en place.

**9593** Dans les modèles animaux de maladies inflammatoires des voies aériennes, la voie d'administration intranasale et le lavage bronchoalvéolaire (LBA) sont les techniques les plus couramment utilisées. La voie d'administration intranasale permet d'administrer une quantité définie d'allergènes, d'agents pro-inflammatoires, pro-fibrosants et/ou les médicaments ou candidats-médicaments en dose précise. Quant au LBA, il permet de recueillir et d'étudier l'influx de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, tels que les éosinophiles dans l'asthme allergique par exemple.

La maîtrise de ces deux techniques par les expérimentateurs est indispensable pour garantir une bonne reproductibilité et permettre de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles.

Notre objectif est de former les utilisateurs à ces techniques pour garantir la qualité des études menées sur les modèles animaux de maladie inflammatoire chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale est la plus employée pour l'étude des pathologies respiratoires et des cibles thérapeutiques dans les maladies inflammatoires des voies aériennes. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier une pathologie respiratoire.

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. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes, dans des cages 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, de 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 pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

La formation des utilisateurs est donnée par un ingénieur pédagogue et passionné, rompu à ces manipulations, ayant une maîtrise parfaite de ces procédures expérimentales et une connaissance approfondie des animaux et des modèles de maladies pulmonaires.

Ces techniques manuelles nécessitent cependant de bien maîtriser et reproduire les gestes pour garantir une bonne efficacité et reproductibilité.

Nous avons montré de par notre expérience antérieure que l'apprentissage et la maîtrise de ces procédures nécessite 24 souris par apprenti-expérimentateur, dont 18 souris pour l'analyse de la reproductibilité et de la répétabilité de l'apprenti et pour confirmer la standardisation des gestes techniques.

Nous envisageons de former 1 à 3 utilisateurs par an, correspondant à un maximum de 360 souris sur une période de 5 ans.

**9594** Les patients diabétiques ont deux fois plus de risque d'avoir un infarctus et de plus, leurs infarctus sont plus sévères que chez les patients non diabétiques. Cependant, le traitement de l'infarctus chez

les diabétiques est totalement identique à celui des non diabétiques à savoir la reperfusion de l'artère coronaire occluse. La protéine p38-Mitogen Activated Protéine (MAPK) s'active lors du stress cellulaire lors de l'infarctus du myocarde, le développement de l'insulino-résistance (état prédiabétique) et le diabète de type 2.

Bloquer cette voie avec une molécule spécifique permet d'atténuer les lésions cardiaques de l'infarctus, et même d'améliorer la fonction contractile et l'inflammation cardiaques dans l'insulino-résistance. Ceci suggère son utilisation dans le diabète.

Les patients atteints de diabète de type 2 sont traités en première intention par des antidiabétiques qui réduisent l'insulino-résistance et donc l'hyperglycémie (ex : metformine) et qui sont connus par ailleurs pour inhiber la mort cellulaire lors de la souffrance cardiaque par exemple lors de l'infarctus. Le protocole in vivo de notre projet est d'évaluer l'effet sur le cœur de cet inhibiteur et de la metformine administrés en combinaison. Pour cela, nous allons inclure 48 souris dans cette étude. Elles seront traitées quotidiennement pendant 5 semaines.

Notre étude se fera dans le respect de la règle des 3R :

- Réduire : Pour limiter le nombre d'animaux, plusieurs mesures seront faites sur le même animal et des examens seront réalisés en utilisant l'animal comme contrôle interne (avant traitement).
- Raffiner : la metformine est déjà utilisée en clinique donc ne présente pas de toxicité. Le protocole a déjà été optimisé par des collaborateurs étrangers. La mise en place d'une grille d'évaluation lors d'une surveillance quotidienne des animaux permettra de détecter tout signe de mal-être. L'effet sur la fonction cardiaque sera évalué in vivo en non invasif en réalisant une échocardiographie avant le traitement et ensuite une après le traitement.
- Remplacer : Ceci n'a jamais été réalisé auparavant et ne peut être remplacé. Cependant, concernant les effets du traitement sur l'infarctus nous utiliserons une méthode de substitution ex vivo. Ainsi, à la fin du protocole in vivo, le cœur des souris sera prélevé sous anesthésie et expérimenté dans un modèle d'infarctus ex vivo.

**9595** La Bretagne est un des plus riches gisements d'algues au monde, unique en Europe, avec près de 600 espèces répertoriées et plus de 300 000 tonnes valorisables annuellement. Parmi elles, certaines macro-algues sont composées de molécules dotées de qualités nutritives et sanitaires. Plusieurs molécules bioactives dérivées d'algues entrent d'ailleurs dans la composition de produits déjà commercialisés. Le projet présenté ici a pour objectif global de définir des couples molécules / effets biologiques actifs afin de produire une gamme d'extraits d'algue ciblant 3 filières : animaux de rente, animaux de compagnie et nutrition humaine. Il comporte i) une phase technologique visant à développer des procédés d'extraction à haut rendement et éco-efficients des molécules d'intérêt présentes dans les algues vertes, rouges et brunes ii) une phase de tests et de validation in vitro et in vivo visant à déterminer les propriétés d'intérêts conférées par ces composés (immuno-modulation, antimicrobien, effet probiotique, satiété, ...). Dans le cadre du volet piscicole de ce programme, des essais expérimentaux seront réalisés chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'état de santé sera évalué chez le poisson alimenté par les différents extraits d'algue, après une infection virale expérimentale au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI). Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir tout d'abord la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux : volume d'eau adapté avec une oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche, une alimentation adaptée à leur stade de vie, mais également d'appliquer des mesures pour réduire la douleur des individus pendant les procédures expérimentales. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour examiner de manière globale l'état de santé. Au total, 600 truites juvéniles serviront à l'évaluation du pouvoir immunostimulant de deux extraits d'algue. Suite à l'épreuve infectieuse, le suivi de la mortalité et l'analyse d'échantillons de sang prélevés sur les survivants permettront d'obtenir une caractérisation complète des effets possibles des extraits d'algue chez la truite arc-en-ciel.

**9596** Le traitement du cancer par immunothérapie est une avancée clinique majeure. L'immunothérapie consiste à faire combattre le cancer par le propre système de défense du patient, soit en stimulant son système immunitaire, soit en bloquant les mécanismes qui l'inhibent. Ces deux méthodes permettent de restaurer une réponse immunitaire efficace et robuste. La preuve de concept de cette nouvelle approche thérapeutique a été réalisée initialement pour les mélanomes cutanés, à l'aide d'anticorps qui sont désormais utilisés couramment en clinique. D'autres traitements du même type, ciblant d'autres cancers, sont maintenant également disponibles ou en cours de développement. Au préalable, ces thérapies ont été évaluées *in vitro*, mais il est indispensable d'évaluer leur efficacité dans des organismes vivants.

Nous allons, dans un premier temps, développer et optimiser un modèle préclinique de souris humanisées, ce sont des souris immunodéficientes reconstituées avec des cellules du système immunitaire humain.

Dans un deuxième temps, ces souris seront injectées avec des cellules tumorales humaines ou greffées avec des fragments de tumeurs de patients pour différents types de cancer sélectionnés (entre autres mélanome cutané, mélanome de la choroïde, cancer du sein, du poumon et de l'ovaire). Enfin les thérapies seront administrées par gavage oral ou injection sous-cutanée, intrapéritonéale et intraveineuse. Les animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux souris, les greffes de tumeurs se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus. Des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le nombre d'animaux est évalué à 9296 souris sur 5 ans.

Ce nombre a été réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus.

Tous les patients ne répondent pas aux immunothérapies, ce projet devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement et de choisir la ou les « molécules candidates » les plus prometteuses dans le traitement du cancer.

**9597** Les huiles essentielles sont souvent utilisées en médecine populaire comme traitements de remplacement de nombreuses affections. Certaines d'entre elles sont utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires ou antiseptiques chez les humains et les animaux. Celles ayant un pouvoir antibactérien permettent de diminuer l'utilisation d'antibiotiques.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'innocuité de nouveaux mélanges d'huiles essentielles appliqués sur peau saine et sur peau altérée, chez le chien.

Bien qu'étant rarement un traitement de référence, les huiles essentielles, correctement diluées, peuvent être utilisées, comme topiques, dans le traitement de maladies cutanées animales et humaines. La tolérance est un élément essentiel des topiques à base d'extraits végétaux et il est essentiel de vérifier que les mélanges n'induisent pas d'irritation. La difficulté à traiter une maladie cutanée entraîne souvent des douleurs, des inflammations et des infections, qui évoluent éventuellement vers une chronicité de la maladie.

Tous les ingrédients des formulations testées dans ce projet sont autorisés en cosmétique humaine et leur pH est ajusté à 7. Pour les extraits de plantes bruts, aucune réaction n'a été observée lors d'une étude expérimentale d'efficacité sur des chiens.

Pour ce projet, il est envisagé d'utiliser, au maximum, 5 chiens. C'est le nombre minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et exploitables à l'aide de tests statistiques, selon l'avis d'un biostatisticien.

La réponse aux questions scientifiques posées implique le suivi des différentes étapes. Pour cela, un examen clinique et l'étude du comportement de l'animal, seront effectués quotidiennement et de façon rigoureuse. Ainsi, des études chez l'animal vivant permettent de réunir tous ces paramètres et d'observer l'évolution au cours du temps.

Pendant toute la durée du projet, tout sera mis en œuvre pour assurer un confort optimal des animaux, en particulier, un enrichissement du milieu sera mis en place, à l'aide de jouets, de caresses et récompenses lors des examens cliniques, etc.

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

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

**9598** Les vétérinaires sont quotidiennement confrontés à des situations de détresse organique qui requièrent de leur part une prise de décision rapide et ajustée pour ramener l'organisme défaillant dans un mode de fonctionnement compatible avec sa survie. Cette situation est rencontrée par exemple lors d'une défaillance accidentelle ou malade des fonctions circulatoire ou ventilatoire, ou lors de la surveillance anesthésique pendant une opération chirurgicale.

L'acquisition de compétences larges pour prendre en confiance les bonnes décisions et réaliser efficacement les gestes essentiels est un long processus, étalé sur plusieurs années de formation spécialisée. Au cours de la formation initiale, les étudiants sont formés intellectuellement par un apprentissage entre autres des savoirs en anatomie, physiologie, pharmacologie, médecine, anesthésie et chirurgie dont la synthèse les prépare à 1) décrire les mécanismes physiologiques qui sous-tendent le maintien de l'homéostasie corporelle, 2) décrire les mécanismes pathogènes qui induisent la perte d'homéostasie et 3) mettre en œuvre les méthodes visant à rétablir l'homéostasie chez les patients. En parallèle, les étudiants sont préparés à acquérir un savoir-faire et un savoir-être, au travers de gestes compris, répétés et assimilés individuellement ou au sein d'un groupe d'intervenants, de sorte que le patient soit pris en charge selon les bonnes pratiques.

Ce projet de travail pratique sur un lapin anesthésié s'inscrit dans cette formation initiale des vétérinaires et est indispensable. Inséré dans un parcours pédagogique complet associant des cours et des méthodes actives tels que des travaux dirigés, une préparation des gestes sur modèles inertes ou vidéos, il vise à renforcer leur savoir et les initie aux savoir-faire et savoir-être par une mise en situation réelle sur un animal anesthésié. Il est capital de former les étudiants vétérinaires aux techniques réanimatrices, chirurgicales et impensable de le faire la première fois sur des animaux de propriétaires. Cette séance de travaux pratiques est dédiée à cet apprentissage.

Après avoir observé des groupes incluant un nombre variable d'étudiants, nous avons établi que le nombre maximum d'étudiants par animal ne pouvait excéder 5 ; au-delà, le bénéfice de la formation pratique est très engagé. En conséquence, la séance de TP utilise 4 lapins pour 16 à 20 étudiants, ce qui représente un nombre annuel de 34 animaux et 170 pour les 5 années du projet.

Les animaux sont maintenus anesthésiés et sous couverture analgésique pendant toute la durée de la séance de TP. A l'issue de ce travail pratique, les animaux sont euthanasiés et congelés. Leur cadavre sera utilisé dans le cadre d'un TP de chirurgie destiné aux mêmes étudiants. Les animaux, utilisés dans ce projet en nombre optimisé pour tendre vers un nombre minimal, sont donc valorisés au maximum par ce couplage pédagogique.

**9599** Les plaquettes sanguines sont des éléments essentiels de l'hémostase qui conduit à la formation du caillot et arrête le saignement. Elles sont également impliquées dans plusieurs pathologies telle que l'athérombose, comme l'atteste l'efficacité des thérapeutiques antiplaquettaires (ex : aspirine) pour prévenir les thromboses artérielles.

Ce projet concerne la caractérisation des mécanismes qui régulent l'activation des plaquettes à l'origine de la thrombose, dans le but de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Il a été montré, in vitro, l'importance d'une protéine impliquée dans la libération de molécules qui régulent l'activation plaquettaire. Cependant il n'existe pas à ce jour d'inhibiteurs spécifiques qui puissent nous permettre de mieux caractériser son mécanisme d'action sur les cellules.

C'est pourquoi nous souhaitons valider ces résultats en étudiant l'activité fonctionnelle des plaquettes provenant du sang de souris dépourvues de la protéine étudiée (souris transgéniques) et en les comparant avec celles de souris contrôles.

Le modèle murin nous permettra aussi de confirmer in vivo, le rôle de cette protéine d'intérêt en prenant ainsi en compte tous les facteurs qui interviennent dans les mécanismes hémorragiques et thrombotiques (en particulier, les cellules de la paroi vasculaire). Ainsi, la comparaison des réponses des plaquettes des deux groupes de souris nous permettra d'établir si cette protéine participe aux mécanismes à l'origine des thromboses ou, inversement, à l'origine des hémorragies. Ce modèle permettra également de définir de nouvelles cibles thérapeutiques (qui font l'objet d'un vif intérêt dans la prévention des maladies thrombotiques). Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés,



l'application, au fur et à mesure des expériences, d'études statistiques, nous permettra éventuellement de réduire le nombre d'animaux. Par ailleurs, dans l'objectif de suivre la règle des 3R, nous développons régulièrement sur sang humain de nouveaux tests d'étude de l'hémostase nécessitant moins de sang. Ces tests, appliqués au modèle murin, nous permettent de diminuer le nombre de souris nécessaire pour effectuer l'ensemble des études nécessaires pour caractériser l'activité des plaquettes des souris.

Afin de mener à bien ce sujet qui va de la recherche fondamentale à la recherche appliquée avec pour objectif de développer de nouveaux médicaments anti-thrombotiques, 1737 souris seront nécessaires. Elles seront réparties en lots qui recevront par gavage ou par injection intrapéritonéale des molécules modulant l'activation plaquettaire.

Afin de caractériser le rôle de la protéine plaquettaire étudiée dans l'ensemble des mécanismes intervenant dans la formation du caillot ou dans l'arrêt du saignement, nous effectuerons :

- soit des prélèvements de sang afin de comparer, dans des tests in vitro, la réactivité des plaquettes isolées des souris témoins ou transgéniques ;
- soit des mesures de temps de saignement à la queue
- soit un modèle de thrombose.

Excepté l'administration (par gavage ou par injection intra-péritonéale) des molécules modulant l'activation plaquettaire, toutes les autres procédures se dérouleront sous anesthésie et analgésie. Les souris ne seront pas réveillées en fin de manipulation (procédure sans réveil) et elles seront euthanasiées conformément aux exigences réglementaires en vigueur. Bien que les procédures de ce projet fassent partie des procédures considérées comme ne devant pas entraîner de souffrance chez l'animal, des points limites ont été établis, qui entraînent la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire

**9600** Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde. Des métastases hépatiques apparaissent chez 50% des patients. Le traitement chirurgical à visée curative qui représente le traitement de référence, ne peut être appliqué que dans moins de 30% des cas. Depuis quelques années, les traitements locorégionaux thermiques comme les radiofréquences (RFA) sont très utilisés dans la pratique clinique pour traiter les métastases dans le foie mais cette stratégie donne des résultats insatisfaisants. Cependant chez les patients traités par les RFA, il a été observé une augmentation de la réponse immune. Optimiser cette réponse pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de ce traitement. C'est pourquoi, l'objectif de notre projet consiste à évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique anti-métastatique en associant un traitement thermique par RFA à une immunothérapie.

Le cancer est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement le microenvironnement tumoral, permet d'étudier l'efficacité du traitement. L'efficacité de notre stratégie sera évaluée sur un modèle murin de métastases hépatiques de cancer colorectal. Ce type de modèle permet de mimer le stade métastatique du cancer colorectal souvent observé au niveau du foie chez l'homme.

Dans un premier temps, le système immunitaire des animaux sera stimulé par vaccination. Trois semaines plus tard, les animaux recevront une injection de cellules cancéreuses d'origine colorectales dans le foie. Après croissance ces cellules formeront une métastase primaire de cancer colorectal. Au stade de croissance souhaité, les métastases primaires seront traitées par la méthode thermique de RFA. Ce traitement sera suivi d'une injection intra-tumorale d'un gel contenant des agents immunomodulateurs. Après cela, une seconde métastase sera injectée à distance du site de la métastase primaire par injection sous cutanée de cellules cancéreuses colorectales. Enfin, pour mimer au mieux la situation clinique, une partie des animaux recevra une cure de chimiothérapie par voie systémique. La réponse à ce traitement combiné sera évaluée d'une part par le suivi de l'évolution de la croissance des métastases primaires traitées et des métastases secondaires par imagerie optique et par la survie des animaux. D'autre part, après mise à mort d'une partie des animaux, nous étudierons la réponse immune liée au traitement sur les différents organes prélevés (rate, ganglions drainants et métastases secondaires) par différentes approches analytiques. Nous utiliserons 360 souris BALB/cJRj femelles pour évaluer cette stratégie thérapeutique.

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, nous limiterons le nombre d'expérience et de souris nécessaires. Nous avons préalablement évalué in vitro plusieurs formulations thermosensibles pour tester uniquement la formulation optimale chez l'animal. De plus, l'utilisation de l'imagerie optique permet de réaliser en temps réel le suivi de l'évolution tumorale sans euthanasier l'animal. Cette technique non invasive permet ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux et de raffiner l'expérience.

Une surveillance régulière sera assurée après la chirurgie, tous les jours pendant la première semaine puis tous les 2-3 jours. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les traitements et les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale. De plus, des antalgiques seront systématiquement administrés après les interventions chirurgicales. Enfin, des points-limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de cette étude nous permettront de déterminer l'efficacité de l'association de la RFA et de l'immunothérapie dans le traitement des métastases. Ils pourraient conduire à un essai clinique chez l'homme pour intégrer cette stratégie dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

**9601** L'hyperacousie est une pathologie qui affecte une part significative de la population générale. Pourtant, les données restent encore limitées comparées à d'autres pathologies de la sphère auditive. Nous pensons que dans le cas de l'hyperacousie, les changements physiologiques qui apparaissent seraient dus à des altérations de la mise en jeu des boucles réflexes acoustiques.

Les deux principales boucles de rétrocontrôle auditives sont le réflexe de l'oreille moyenne et le réflexe du système efférent olivo-cochléaire médian. Il est possible de mesurer ces réflexes à l'aide de méthodes objectives basées sur l'enregistrement de l'activité électrique de divers relais de la voie auditive. Les cellules ciliées de l'apex de la cochlée codent les basses fréquences et celles de la base codent les hautes fréquences. C'est pourquoi nous procéderons à l'enregistrement des otoémissions acoustiques. Cet enregistrement constitue une méthode d'évaluation des propriétés électromotiles des cellules ciliées en utilisant plusieurs fréquences différentes comme stimulation.

Expérimentalement, le salicylate de sodium (SS), ingrédient actif de l'aspirine, est connu depuis longtemps pour induire une perte auditive temporaire et des acouphènes aigus chez les humains et les animaux et a servi de modèle extrêmement utile pour étudier les mécanismes neuronaux et biologiques sous-jacents des acouphènes et l'hyperacousie. Ce modèle est simple à mettre en place puisqu'il consiste à injecter par voie intrapéritonéale une forte dose de salicylate de sodium. Alors que de fortes doses de salicylate sont connues pour induire des acouphènes dans des modèles animaux, des études plus récentes indiquent que le salicylate augmente également l'amplitude du réflexe de sursaut acoustique, les résultats étant interprétés comme des signes d'hyperacousie mais aussi liés au stress.

Le réflexe acoustique de sursaut est provoqué par un son fort et inattendu. Il s'agit d'un mécanisme de protection qui se traduit par un clignement des yeux, un haussement des épaules et une contraction des muscles du tronc. Chez l'Homme, il intervient entre 30 et 50 ms après le bruit. Chez le rat, une injection de 250 mg/kg de salicylate induit une augmentation de l'amplitude du réflexe acoustique de sursaut et particulièrement à 80, 90 et 100 dB SPL. Elle est interprétée comme traduisant un comportement lié à de l'hyperacousie.

Pour réaliser cette étude, nous aurons 2 groupes d'animaux comprenant chacun 10 animaux : 1 groupe contrôle sérum physiologique et 1 groupe recevant le salicylate de sodium. Le but du projet est d'étudier les réflexes acoustiques chez le rat et les modifications fonctionnelles induites par l'hyperacousie.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur, ils seront stabulés dans des cages enrichies avec des jouets pour diminuer leur stress. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests (le salicylate de sodium induit de l'hyperacousie dans 50 à 70% des cas) ou qui présenteraient des pertes auditives dues à la présence d'otite, mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 20 rats seront utilisés dans ce projet. Pour évaluer l'audition, nous réalisons les tests

fonctionnels sur l'animal anesthésié. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésie. Aucune méthode alternative ne permet à ce jour de remplacer ce protocole.

**9602** Les maladies autoimmunes représentent un problème de santé publique. Le projet vise à étudier le rôle d'une protéine, la PLSCR1, dans une de ces pathologies, le lupus systémique érythémateux. Cette maladie se caractérise par une réaction immunitaire contre l'organisme lui-même, induisant des réactions inflammatoires pouvant aboutir à une perte de fonction des organes atteints. Le projet étudiera l'implication de la PLSCR1 dont les propriétés biochimiques et physiologiques suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans plusieurs aspects de la maladie afin de déterminer si elle est un simple marqueur de la maladie ou un acteur important de son développement en utilisant un modèle animal et par des études transversales chez le patient. Pour cela nous utiliserons un modèle de souris développant la maladie après injection intra-abdominale d'un irritant, le pristane. Ce modèle animal est maîtrisé dans le laboratoire. Il nécessite de laisser vieillir les souris après injection de pristane (ou de solution tampon PBS comme contrôles non malades). Le développement de la maladie sera comparé entre des souris n'exprimant pas la PLSCR1 (souris KO) et des souris exprimant la PLSCR1 (souris WT). Ces souris KO, génétiquement modifiées, ont un phénotype qui n'est pas dommageable. Nous attendons au contraire qu'elles soient protégées de la maladie. Des échantillons de sang et d'urine seront prélevés à différents temps et des prélèvements d'organes seront faits en phase finale sur animaux euthanasiés. Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans dans des locaux agréés. Ce projet nécessitera un nombre total de 60 animaux au total.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte : 1) réduction : nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 15 par sous-groupe. 2) raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. La procédure d'injection de pristane aux souris de fond génétique C57Bl6 (fond génétique de nos souris KO et WT) n'induit aucune souffrance manifeste des animaux. En cas inattendu d'atteinte de point-limite de souffrance par l'animal (perte de poids au-delà de 20% par rapport au groupe contrôle, prostration et arrêt de toilettage, poil hérissé) celui-ci sera euthanasié immédiatement. Avant prélèvement des organes à analyser l'euthanasie des animaux sera toujours faite par inhalation de CO<sub>2</sub> suivie de dislocation cervicale. 3) remplacement : les connaissances issues de cette étude in vivo et ex vivo ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse inflammatoire qui nécessite, pour obtenir les données recherchées, de travailler à l'échelle d'un organisme. Des études in vitro sont, par ailleurs, prévues pour étudier d'autres paramètres et qui compléteront ce volet d'expérimentation animale sans pouvoir le remplacer.

**9603** Le vieillissement cellulaire (sénescence), processus clé dans la physiopathologie des maladies pulmonaires, représente une nouvelle cible thérapeutique. En effet l'accumulation de cellules sénescentes au niveau des poumons conduit à la fibrose pulmonaire et à la BPCO (bronchopneumopathie chronique obstructive) qui font suite à une intoxication tabagique.

L'activation de la protéine PLA2R1 (récepteur 1 de la phospholipase A2) semble être un élément majeur impliquée dans la sénescence cellulaire. Ainsi la voie moléculaire sous-jacente au récepteur PLA2R1, peut servir de cible pharmacologique dans la prévention de la sénescence cellulaire pour atténuer les manifestations pathologiques chez l'homme.

L'objectif scientifique du présent projet consiste à évaluer in vivo le rôle de PLA2R1 dans le vieillissement pulmonaire et en définir les applications thérapeutiques. À cette fin, nous allons surexprimer PLA2R1 (ou un control) dans des poumons de souris par inhalation d'un vecteur lentiviral. On testera in vivo les conséquences du traitement par un inhibiteur, le Ruxolitinib, sur le seuil de sénescence des poumons. Les souris seront évaluées à 1 et à 3 mois : Nous étudierons, après anesthésie, leur fonction cardiaque, leur pression artérielle pulmonaire, puis les organes seront prélevés pour des analyses biologiques.

Tout au long de ces études in vivo, la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) sera respectée, les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Mise en place de points limites afin de limiter la douleur. Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. A l'heure actuelle aucune méthode ne permet de reproduire les phénomènes attendus.

Le nombre d'animaux dans cette étude est estimé à 120.

**9604** Une trachéostomie est une ouverture chirurgicale pratiquée dans la trachée pour faciliter la respiration. On y insère une canule de trachéostomie pour la garder ouverte. La canule de trachéostomie permet de respirer directement par la trachée au lieu d'avoir à le faire par le nez et la bouche. Une trachéostomie peut être temporaire ou permanente. Toutes les techniques de trachéotomie percutanée (TPC) débutent par une ponction à l'aiguille et l'introduction d'un guide métallique entre deux anneaux trachéaux. Après introduction du guide, une incision cutanée est réalisée. Le guide métallique permet ensuite l'introduction du dispositif de dilatation qui réalise l'orifice de trachéotomie et de guider l'insertion de la canule de trachéotomie dans la trachée. La technique est antérograde (de la peau vers la trachée) sauf pour la technique translaryngée de Fantoni (de la cavité buccale vers la peau).

Dans le cas présent, l'étude porte sur un nouveau guide métallique introduit par voie rétrograde (de la trachée vers la peau) tout en gardant une procédure antérograde pour la pose de la canule (méthode de Ciaglia – pratique standard en TPC).

Ce projet vise à l'évaluation préclinique sur modèle porc de la procédure Ciaglia rétrograde en comparaison avec la méthode Ciaglia antérograde conventionnelle. Cette nouvelle technique est rendue possible par le développement d'un nouveau guide. Ce guide a des caractéristiques semblables à ceux utilisés en version antérograde, sauf qu'une de ces extrémités permet le percement de la trachée de manière directe. Les avantages attendus de cette nouvelle technique sont la diminution de complications telles que la ponction de la paroi postérieure de la trachée ou de l'œsophage, les fausses routes, et la ponction des tubes endotrachéaux ou du bronchoscope lors de l'installation.

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

**Remplacement :** Il n'est pas possible de remplacer le modèle in vivo pour parvenir à l'objectif scientifique du projet. Pour tester la sécurité et l'efficacité (diminution de complications) du dispositif chirurgical en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs utilisés en pratique humaine.

**Réduction :** Il s'agit d'une étude pilote et il n'y a pas de bases statistiques pour définir le nombre d'animaux de manière précise. Cependant, basé sur l'équation de ressources, le nombre de procédures chirurgicales réalisées sur chaque animal et le nombre d'animaux utilisés ont été optimisés pour réduire au maximum le total d'animaux utilisés et obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 54 animaux représentent un effectif nécessaire et suffisant. Afin d'optimiser au mieux l'utilisation du modèle animal, nous n'incluons dans un premier temps que 18 animaux afin d'avoir des premières données à analyser. En fonction de cette première analyse, nous améliorerons le dispositif si nécessaire et déciderons de la poursuite ou de l'arrêt de l'expérimentation (jusqu'à 3 itérations sont anticipées).

**Raffinement :**

Les animaux sont hébergés en groupe social dans un environnement enrichi avec paramètres contrôlés (température, hygrométrie, luminosité). Ils sont sédatisés pour les manipulations et toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale par un chirurgien expérimenté avec contrôle de la douleur per opératoire.

Des critères d'arrêt anticipé en cas de survenue d'une complication ont été définis.

Les animaux sont euthanasiés en fin de procédure après évaluation des complications per opératoires et la qualité du geste, sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

**9605** La fibrose du foie est une conséquence majeure des maladies hépatiques chroniques telles que les hépatites, les maladies métaboliques (stéatose hépatique, obésité) ou encore l'alcoolisme. La fibrose

peut évoluer en cirrhose puis en cancer du foie - l'un des cancers les plus mortels. A ce jour, il n'existe pas de traitement standard pour traiter la fibrose ou la cirrhose hépatique. Cependant, un effort constant de la recherche a permis de mieux comprendre les mécanismes de développement de la fibrose, mettant en évidence différents facteurs biologiques responsables de la maladie qui peuvent être utilisés comme cibles dans de nouveaux traitements.

L'objectif de notre projet est de développer des médicaments pour traiter la fibrose hépatique. Pour cela nous utiliserons le modèle de fibrose hépatique que nous avons mis en place chez la souris afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de différentes molécules issues d'extraits naturels de plante, le *Capsicum baccatum*, un piment rouge, sur l'évolution de la maladie.

Après avoir déterminé les systèmes thérapeutiques les plus efficaces in vitro, ceux-ci devront être testés chez l'animal. La souris est un excellent modèle animal pour les pathologies hépatiques et notamment pour la fibrose car les caractéristiques de la maladie développée chez la souris sont proches de la maladie humaine. Ce modèle animal récapitule toutes les étapes du développement et les potentielles variabilités de la maladie à l'échelle de l'organisme entier. Un tel niveau d'information ne peut pas être obtenu à l'aide d'un modèle in vitro uniquement.

Pour développer une fibrose, les souris sont soumises à un régime alimentaire particulier (ne contenant pas certains acides aminés) pendant une durée maximale de 16 semaines. Ce régime pouvant entraîner une légère perte de poids des animaux, leur état sera surveillé quotidiennement. Au cours du développement de la fibrose, les nouvelles molécules seront administrées par gavage aux souris afin de déterminer lesquelles s'avèrent les plus efficaces. Pour pouvoir atteindre les objectifs de ce projet, prévu sur 5 ans, un total de 190 souris au maximum sera nécessaire. Un suivi quotidien des animaux est assuré avec la mise en place de points limites spécifiques.

Les procédures expérimentales nécessaires à ce projet ont été élaborées et réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux tout en permettant de réaliser une étude statistique valable. Le modèle de fibrose que nous avons choisi consiste uniquement en l'apport d'une alimentation spécifique, il a l'avantage de refléter le plus fidèlement la pathologie humaine, et n'entraîne pas de mortalité des animaux au contraire des modèles de fibrose hépatique les plus courants basés sur l'injection de composés toxiques.

Les résultats de ce projet nous permettront de déterminer les agents thérapeutiques à base de composés végétaux intéressants pour le traitement de la fibrose hépatique chez l'homme. Nous espérons que cette étude sera un premier pas vers la découverte de nouveaux médicaments pour soigner la fibrose et la cirrhose hépatiques, actuellement incurables.

**9606** La peau est actuellement considérée comme la meilleure voie pour l'administration de composés immunothérapeutiques ou vaccinaux. Cette particularité réside dans le fait que la peau présente une densité exceptionnelle en cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques. Ces cellules, en tant que « chef d'orchestre » du système immunitaire, sont à même d'activer ou de moduler la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Malgré tout, la grande majorité des vaccins actuels sont administrés par voie intramusculaire, essentiellement pour des raisons pratiques. Or, le muscle contient peu de cellules dendritiques, obligeant à l'utilisation de molécules chimiques aux propriétés immunostimulantes (adjuvant). La phobie de l'aiguille, la douleur générée par l'injection intramusculaire, ainsi que l'utilisation d'adjuvant, participent malheureusement à la méfiance de l'opinion publique vis-à-vis des vaccins et entraînent la recrudescence d'infections jusque-là maîtrisées telles que la rougeole.

Dans ce projet, nous proposons de développer un vaccin expérimental basé sur l'application de patchs épicutanés permettant de présenter de faibles quantités d'antigène au système immunitaire au travers d'une peau intacte. Par le ciblage des couches superficielles de la peau, l'absence de passage sanguin de l'antigène et l'absence d'adjuvant, ce traitement présente un profil de sécurité favorable. De plus, l'application de patch ne génère aucune douleur et ne requiert pas l'intervention de personnel de santé pour être administré. Notre traitement est efficace chez le jeune enfant et nous voudrions l'optimiser pour une utilisation chez l'adulte pour lequel l'épaisseur de la couche cornée supérieure de la peau est plus importante. Dans ce contexte, nous étudions plusieurs solutions pouvant permettre d'optimiser le passage de l'antigène sur peau adulte. Nous envisageons

notamment le développement d'un système expérimental 2 en 1 constitué d'un patch épicutané comprenant une grille de microaiguilles.

Notre projet vise donc à tester et calibrer ce nouveau système d'administration dans un modèle animal. Nous souhaitons utiliser le porc car il constitue le meilleur modèle préclinique de peau humaine. Ce projet durera 5 ans et comprendra 2 procédures expérimentales sur un total de 330 porcs Large White. Ce nombre d'animaux est justifié par la nécessité de tester plusieurs tailles de microaiguilles et plusieurs durées d'application. Outre la vaccination, nous étudierons également le potentiel de ces patchs à microaiguille à améliorer l'administration de plusieurs allergènes (arachide, lait, œuf, fruits à coque) et ainsi à développer un traitement efficace contre les allergies alimentaires. Le nombre d'animaux inclus dans une expérience répond à des besoins statistiques et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins négatifs.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). La stratégie pour réduire le nombre d'animaux reposera sur des expériences préliminaires réalisées sur des explants de peau permettant ainsi de valider le modèle et d'affiner le design de notre patch expérimental. Les porcs seront hébergés par groupes sociaux et disposeront d'eau et de nourriture à volonté. Ils ne seront manipulés qu'après 10 jours d'acclimatation. Afin d'enrichir le milieu, les animaux auront à leur disposition des jeux tels que des balles, mordillos, chaînes. De plus, une gestion précise de l'anesthésie/analgésie est étudiée pour chaque procédure expérimentale en vue d'optimiser le bien-être animal. Des points limites ont également été établis pour l'ensemble des procédures expérimentales.

Le remplacement n'est pas envisageable car il n'existe, à l'heure actuelle, aucune méthode *in vitro* ou *ex vivo* permettant de tester l'efficacité d'un vaccin ou de mimer la complexité d'un système immunitaire complet.

**9607** Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 3ème cause de mortalité dans les pays industrialisés, la 2ème cause de démence et la 1ère cause de handicap acquis. Parmi ces AVC, ceux d'origine ischémique (liés à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot) sont les plus nombreux (85%). A l'heure actuelle, le seul traitement pour ce type d'AVC est l'administration d'un thrombolytique (l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant, rt-PA) qui a pour but de détruire le caillot. Cependant, l'efficacité de la thrombolyse reste faible : entre 6 et 30% de réouverture de l'artère occluse en fonction de la localisation du caillot. De plus, l'utilisation de rt-PA est associée à une augmentation du risque hémorragique. Les hémorragies post-ischémiques sont d'autant plus graves que le thrombolytique est administré tardivement, ce qui a conduit à restreindre son utilisation à une fenêtre de 4h30 après le début des symptômes. Dans ce contexte, il est indispensable de rechercher des stratégies permettant d'améliorer l'action du rt-PA, sans augmenter le risque hémorragique.

Les données de pharmacologie expérimentale confirment le possible bénéfice de la molécule "X" associée au rt-PA en termes de survie et de diminution de la taille des lésions dans le traitement aigu de l'AVC ischémique. Cette molécule, brevetée par une firme pharmaceutique, est actuellement en essai clinique de phase 1 chez le volontaire sain et aucune toxicité n'a été observée à ce jour.

L'objectif du présent projet est de s'assurer que l'association de la molécule "X", molécule qui semble prometteuse en terme de neuroprotection, n'augmente pas le risque hémorragique lorsqu'elle est associée au rt-PA, dans un modèle d'ischémie cérébrale présentant des hémorragies cérébrales majorées, comme en clinique, par le rt-PA.

Les études seront réalisées chez des souris (126 souris au total). Ces souris seront anesthésiées puis soumises à une ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, un modèle qui reproduit la pathologie humaine. Une première étude consistera à déterminer l'effet du rt-PA administré dans la veine de la queue deux heures après l'ischémie sur la reperfusion et les hémorragies cérébrales, ainsi que sur le volume de la lésion et l'œdème cérébral, deux paramètres importants mesurés chez les patients pour évaluer la sévérité de l'AVC. Une deuxième étude permettra d'évaluer les effets de l'association de la molécule X (administrée dans la veine jugulaire) au rt-PA en terme d'hémorragies cérébrales ainsi que sur le volume de lésion et l'œdème cérébral.

Afin de prévenir toute douleur, les animaux seront traités par un antalgique deux fois par jour (une première fois 30 minutes avant la chirurgie nécessaire à l'ischémie cérébrale, une deuxième fois 8

heures après). Un point limite reposant sur l'observation des animaux est défini afin de déterminer la nécessité d'une mise à mort anticipée.

Ce modèle est très reproductible et n'entraîne qu'une très faible mortalité ; ces deux éléments permettent de réduire le nombre d'animaux par groupe. Par ailleurs, la technique choisie pour évaluer les hémorragies cérébrales permet de mesurer sur les mêmes animaux le volume de l'infarctus et celui de l'œdème cérébral.

L'ensemble de ce travail permettra de déterminer si la molécule "X" capable d'améliorer la thrombolyse par le rt-PA et de protéger les neurones n'augmente pas le risque hémorragique; cette étude est indispensable avant de démarrer l'essai clinique de phase 2 avec la molécule "X" chez les patients victimes d'AVC ischémiques.

**9608** Impact de la flore microbienne dans la survie des cellules souches intestinales de la souris.

Objet du projet : recherche fondamentale

La connaissance de l'influence du microbiote sur l'organisme provient en grande partie d'études comparatives entre animaux sans germes (axénique ou « germ-free » : GF) et animaux conventionnels (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés : EOPS) ayant acquis un microbiote à la naissance. Ces modèles ont révélé que le microbiote facilite la digestion, régule le stockage de calories, métabolise les xénobiotiques, dont certains médicaments ou agents cancérigènes, module le développement et le renouvellement des cellules de l'épithélium intestinal et permet la maturation et la modulation du fonctionnement du système immunitaire. L'influence potentielle du microbiote sur la toxicité digestive des agents anticancéreux a aussi été étudiée. La toxicité des médicaments anticancéreux, tels que la chimiothérapie et la radiothérapie, a un impact néfaste sur la régénération épithéliale, provoquant une inflammation et des lésions qui affectent la muqueuse intestinale, ce qui perturbe sa fonction de barrière.

Nous souhaitons maintenant comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'effet protecteur de la flore sur les cellules souches intestinales (CSI). Dans le but d'étudier le rôle de la flore digestive commensale (microbiote) dans la survie des CSI, nous souhaitons induire des dommages au niveau de l'épithélium intestinal afin d'évaluer la capacité des CSI à répondre à cette agression et de continuer à proliférer et à se différencier. L'influence du microbiote sur la survie des CSI sera particulièrement étudiée.

Nous allons donc procéder à des expériences in vivo utilisant des modèles murins, mais aussi des expériences in vitro complémentaires en utilisant le modèle de culture d'organoïdes murins. L'utilisation d'un modèle in vitro permettra de tester des agents inhibiteurs/activateurs des voies de signalisation étudiées et donc de réduire le nombre d'animaux étudiés. Nous prévoyons d'utiliser des souris femelles et mâles âgées de 7 semaines, EOPS, transgéniques (génétiquement modifié pour les différentes voies de signalisation étudiées) ou non, et GF. Chaque groupe (hormis le groupe GF) sera traité ou non par antibiotique. Pour chaque point expérimental nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique. Nous comptons utiliser 6 lignées de souris (EOPS contrôles, GF et 4 lignées EOPS transgéniques), ce qui fait un total pour ce projet de 1344 souris, en 3 procédures de classe de sévérité modérée. Les animaux seront élevés en groupe, avec un équipement et des conditions sanitaires adéquates. Les animaux ne sont jamais privés de nourriture et de boisson. Pendant la durée de l'expérience, ils restent dans leur environnement habituel. Les animaux ne sont pas isolés afin de maintenir une certaine sociabilité. Les protocoles d'exposition aux agents anticancéreux ont déjà été utilisés chez les souris et ne donnent pas lieu à des manifestations de gêne ou de douleur chez les animaux. Les animaux seront systématiquement surveillés avant, pendant et après les procédures. Pour les actes chirurgicaux, antibiothérapie préventive, anesthésie générale et analgésie pré- et post-opératoire sont prévues. Dans l'éventualité où des animaux seraient durablement malades, ils seront mis à mort pour éviter toute souffrance.

Le bénéfice attendu est une identification des éléments du microbiote permettant une régénération épithéliale après une exposition aux agents anticancéreux, avec pour objectif de diminuer les effets secondaires liés à ces traitements.

**9609** L'endoscopie est une technique régulièrement utilisée chez les petits ruminants pour l'insémination intra-utérine, la préparation de la collecte d'embryons, le transfert embryonnaire et la ponction folliculaire échoguidée (ovum pick up, OPU). Elle a pour objet de vérifier l'état des ovaires et le statut physiologique préalablement à ces procédures ou d'intervenir directement sur les organes.

Elle peut servir de vérification préalable à une laparotomie (collecte) ou seule pour les interventions les moins invasives (transferts, inséminations, OPU). Elle requiert l'apprentissage du geste technique, de la posture et de la bonne reconnaissance visuelle des organes sans ouverture de la paroi abdominale. Notre objectif est de former notre vétérinaire référent à cette technique. Cela permettra le développement de techniques mini invasives.

Le principe des 3R a été respecté comme suit :

- Remplacement, le vétérinaire se formera sur des automates d'entraînement à la coelioscopie préalablement aux essais in vivo. Cette phase in vivo est indispensable pour bien appréhender les temps cruciaux de la chirurgie : manipulation atraumatique des organes, hémostase, etc.

- Réduction : Nous utiliserons 4 brebis sur 3 demi-journées successives. Ce nombre est minimal pour maîtriser les différentes étapes de l'endoscopie. Les brebis retourneront sur le lieu d'élevage après intervention.

- Raffinement : tous nos travaux pratiques seront réalisés sous anesthésie générale avec injection d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans une case propre sur copeaux. On veillera à ne pas laisser le dernier seul avant son anesthésie pour limiter le stress de l'isolement. Les animaux se réveilleront en groupe, dans une case abondamment paillée.

**9610** Plus de cinq millions de personnes nécessitent annuellement des soins pour le traitement de plaies telles que brûlures superficielles ou profondes, escarres, ulcères de jambes de patients diabétiques, blessures de guerre, par exemple. Le problème de la cicatrisation des plaies va en s'accroissant du fait de l'allongement de la durée de vie des patients, du vieillissement de la population et de l'augmentation de la population diabétique.

Bien qu'il existe d'innombrables pansements destinés à accélérer la cicatrisation cutanée sur le marché, de nombreux problèmes persistent dans la prise en charge des cas les plus complexes pour lesquels le rôle de barrière de la peau contre les infections n'est plus assuré. D'importantes avancées ont été apportées par la mise au point de pansements d'origine biologique qui interagissent avec le tissu lésé et fournissent un environnement favorable à la formation du tissu de granulation dermique. Si certaines plaies, en particulier les plaies superficielles, peuvent bénéficier de pansements, plus ou moins sophistiqués, les plaies profondes nécessitent souvent le recours à la greffe de peau. Si la plaie est de petite taille, la greffe peut être prélevée directement sur le malade. Dans le cas de plaies de grande taille, il est nécessaire de recourir à des greffes de peaux reconstruites in vitro à partir de biopsies de peau du malade après séparation des kératinocytes et des fibroblastes, cultures de ces deux types cellulaires et construction de lambeaux de peau. Cette reconstruction de peaux in vitro prend plusieurs semaines pendant lesquelles la protection de l'organisme n'est plus assurée au niveau des plaies.

Une technique novatrice a été mise au point récemment, la greffe extemporanée par imprimante 3D. L'objectif principal de ce projet est de comparer la qualité de cicatrisation de greffes autologues reconstruites classiques avec celle de greffes autologues par imprimante 3D.

Pour cela, au maximum 4 porcs seront utilisés : ce nombre est le strict minimum pour obtenir des résultats interprétables et permettra l'étude de 3 protocoles.

La réponse aux questions scientifiques posées impliquant le suivi de la cicatrisation de plaies traitées par greffe, seules des études chez l'animal vivant le permettent.

Un suivi attentif des animaux sera réalisé dans les études, afin de leur éviter toute souffrance ou stress.

Les porcs sont des animaux sociaux : des contacts avec leurs congénères seront assurés tout au long de l'étude. Ils seront hébergés dans des box adaptés et équipés de matériel d'enrichissement.

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



Ce projet offre de nouvelles perspectives telles qu'une meilleure prise en charge des cas de plaie dont la cicatrisation est difficile (escarres), mais aussi celle qui demandent une prise en charge rapide (blessés de guerre, grands brûlés).

#### **9611** Objectif scientifique du projet

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Nos défenses naturelles par l'intermédiaire de notre système immunitaire sont capables de détecter une cellule tumorale comme un danger pour notre organisme et de l'éliminer.

Cependant, ce processus de surveillance ne permet pas toujours de bloquer le développement tumoral en raison de la mise en place par la tumeur de mécanismes pour échapper au contrôle de notre système immunitaire. Par ailleurs, des thérapies ciblant le système immunitaire se sont montrées très efficaces récemment dans le traitement de certains cancers mais seulement chez un faible nombre de patients. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste un enjeu majeur pour les patients en échec thérapeutique. Dans ce contexte ce projet s'intéresse à un facteur soluble appelé interleukine (IL)-33 dans la défense immunitaire de notre organisme contre les tumeurs. Plus précisément, ce projet de recherche a pour objectif de démontrer le rôle de l'IL-33 dans l'activation des cellules naturelles tueuses (cellules NK) qui possèdent des propriétés anti-tumorales importantes. Pour cela, un modèle de métastases pulmonaires dont la formation est limitée par les cellules NK sera utilisé. Le signal activant les cellules NK dans ce modèle est encore inconnu et nous émettons l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de l'IL-33. Une approche thérapeutique est également proposée, en utilisant différentes lignées tumorales cible des cellules NK qui seront activées par l'injection d'IL-33.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie.

La compréhension des mécanismes de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire est un enjeu majeur aujourd'hui en cancérologie dans la perspective d'exploiter ce potentiel dans de nouvelles approches d'immunothérapie. Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales grâce à leur sécrétion de molécules immunoactivatrices et leur capacité à lyser les cellules tumorales. Cependant, dans les tumeurs avancées les fonctions anti-tumorales des cellules NK sont fréquemment altérées. Ainsi, l'identification de molécules capables d'activer les fonctions anti-tumorales des cellules NK représente une piste thérapeutique intéressante. Nous pensons qu'étudier le rôle de l'IL-33 dans l'immunité anti-tumorale, notamment via l'activation des cellules NK, devrait déboucher sur l'identification d'un nouveau mécanisme de surveillance immunitaire et potentiellement d'une nouvelle cible thérapeutique permettant de moduler positivement l'immunité dans les cancers.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Seul un modèle in vivo chez l'animal peut permettre d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires présentes au sein du stroma. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet (n=780) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux (3 fois par semaine) par des personnels compétents permettra de limiter au maximum toute souffrance animale. Tous les gestes expérimentaux (injection intranasales et IV) sont réalisées sous anesthésies générales profondes (Kétamine/xylazine).

**9612** Les oméga-3 sont impliqués dans de multiples processus physiologiques et ont un impact santé important en termes de prévention et/ou de traitement de maladies chroniques. Dans le cadre d'une prévention des risques cardio-vasculaires, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail préconise un apport nutritionnel (ANC) en ALA (précurseur métabolique des oméga-3) fixé à 1% de l'apport énergétique total (AET) et celles oméga-3 à longues chaînes (EPA et DHA) à 500mg/jour. Cependant, les dernières études épidémiologiques montrent que les apports en oméga-3, sont près de trois fois inférieurs aux recommandations de l'ANSES. Pour exercer leurs effets "santé", ces nutriments lipidiques doivent être "rendus" biodisponibles à l'organisme, c'est à dire la proportion d'un nutriment qui est absorbée par la muqueuse intestinale et qui sera utilisable pour le fonctionnement cellulaire et les fonctions normales de l'organisme. Dans le

contexte actuel où la consommation française des oméga-3 est plus de 2 fois inférieure aux recommandations, il est donc essentiel d'identifier les paramètres à moduler pour améliorer leur biodisponibilité et leur devenir dans l'organisme afin d'accroître leurs bénéfices santé. L'effet de la composition de la matrice (en termes de qualité mais aussi de quantité) sur la biodisponibilité et le devenir des oméga-3, revêt un champ d'investigation d'intérêt pour les industriels des lipides et les consommateurs. En outre la compréhension des mécanismes impliqués permet d'optimiser l'alimentation et de fournir des données pour fixer les recommandations nutritionnelles en France et à l'international.

En effet, les nutriments peuvent interagir les uns avec les autres ou avec d'autres composés alimentaires, ce qui a pour effet de modifier leur biodisponibilité ou de la neutraliser. Ces facteurs sont un point essentiel à prendre en considération dans les études de biodisponibilité, notamment parce qu'ils impactent la première étape qui conditionne la phase d'absorption, à savoir la digestion des éléments lipidiques ainsi que leur solubilisation pour être absorbés. A ce jour, les études visant à définir les paramètres qui permettent de favoriser l'absorption et le devenir métabolique des oméga-3 et en particulier vis-à-vis de leur précurseur, l'ALA, sont éparses. Dans ce cadre, nos travaux de recherche s'articulent sur l'étude des paramètres physico-chimiques ainsi que l'influence de la composition de la matrice alimentaire qui permettent de moduler l'absorption et la biodisponibilité des oméga-3. Il semble que la nature des acides gras environnants comme éléments constitutifs de la matrice alimentaire peut moduler l'absorption intestinale des oméga-3. Les champs d'investigation vis à vis de l'ALA restent encore à explorer dans le but de favoriser la biodisponibilité en fonction de sa forme d'apport tout en limitant la consommation de lipides qui est plus que suffisante dans notre alimentation moderne. Le projet a pour objectif d'identifier les différents paramètres susceptibles d'influencer la biodisponibilité des oméga-3, notamment celle de l'ALA sur modèle animal, le rat, dont les systèmes digestif et d'absorption sont similaires à ceux observés chez l'Homme.

Afin de limiter l'utilisation du modèle animal, nous avons réalisé une étude comparative entre le modèle cellulaire (cellules intestinales humaines Caco-2) et le modèle animal.

Notre étude a mis en évidence que les résultats cellulaires étaient différents de ceux observés chez l'animal ou chez l'Homme, et n'étaient pas exploitables, justifiant de l'utilisation du modèle in vivo (rat) dans les études d'absorption. Dans ce contexte, le calcul statistique montre que l'utilisation minimale de 8 rats par groupe était requise pour mener à bien les études d'absorption.

L'objectif de cette étude vise donc à évaluer chez le rat, l'influence de la forme d'apport des oméga-3 et la nature des acides gras environnants de la matrice alimentaire sur son niveau d'absorption intestinale, son transport et son devenir dans les lipides de la lymphe. Cette étude sera réalisée sur 3 groupes de 8 rats porteurs d'une dérivation du canal lymphatique, posée sous anesthésie générale (Kétamine/xylazine), soit 24 rats au total. Nous étudierons l'impact de la présence d'autres composés lipophiles (polyphénols, antioxydants) (groupe 1), celle de l'émulsion des lipides (groupe 2) et de la famille de lipides (Triglycéride ou phospholipides ; groupe 3). Les lipides seront administrés par intubation gastrique et la lymphe sera recueillie sur 24 heures suivant l'administration des lipides.

Chaque animal suivra un protocole de suivi post-op afin de préserver son bien être par des analgésiques (buprénorphine) si besoin, et ce, afin de limiter la douleur. Ce suivi sera réalisé sur les 24 heures post-op afin d'éviter toute souffrance inutile à l'égard de l'animal. Au terme de l'étude, les animaux seront euthanasiés par excès de phénobarbital sodique (Exagon), qui est la méthode de choix pour l'euthanasie des animaux. D'autre part, il a été mis en place une banque d'organes où des tissus d'intérêt tels que les cellules intestinales et foie sont prélevés pour des études ex-vivo en parallèle, évitant ainsi l'utilisation intempestive d'animaux quand cela est possible.

Ces données permettront de définir des combinaisons lipidiques adéquates afin que les oméga-3 et leur précurseur, puissent jouer pleinement leurs rôles afin d'optimiser les effets santé qui leur sont associés. Les travaux permettront également d'identifier les mécanismes impliqués dans la digestion et l'absorption intestinale des oméga 3. Ce projet s'intègre dans une démarche visant à optimiser la fonctionnalité des aliments et des huiles alimentaires qui sont sources d'oméga-3 en définissant les paramètres physico-chimiques de la matrice alimentaire qui améliorent son absorption et sa biodisponibilité dans l'organisme.

**9613** La racine de chicorée (*Cichorium intybus*) reste la principale source industrielle d'inuline et est également utilisée comme ingrédients alimentaires une fois transformée en farine ou en produits torréfiés. La racine contient d'autres composés majeurs notamment des acides chlorogéniques (encadrés dans les polyphénols) et des lactones sesquiterpéniques, susceptibles de présenter aussi des intérêts nutritionnels.

La consommation de chicorée en tant que matrice alimentaire a été souvent associée avec des effets bénéfiques pour la gestion de l'appétit, et la perte de poids mais aucun mécanisme n'a été encore mis en évidence pour appuyer ces observations. Si certains des métabolites spécialisés identifiés dans la racine de chicorée sont connus pour leurs actions antivirale, anti-inflammatoire, analgésique, ou encore anticancéreuse, les effets bénéfiques sur le microbiote intestinal n'ont pas été encore décryptés.

La chicorée industrielle demeure une culture emblématique de la Région Hauts-de-France qui est le 1<sup>er</sup> producteur européen de chicorée torréfiée. Valoriser les différents génotypes de chicorée, en tant qu'aliments fonctionnels, sources de produits ou d'ingrédients prébiotiques, représente un grand enjeu scientifique qui permettrait aussi de positionner la filière chicorée sur l'amélioration du statut santé du consommateur.

L'objectif de ce projet est de tester différents génotypes de chicorée sélectionnés et utilisés dans l'alimentation sous forme de farine, et de déterminer si les variations dans la composition en inuline mais aussi en polyphénols et lactones sesquiterpéniques induisent des variations dans les paramètres biologiques et physiologiques. Une analyse des effets sur le microbiote intestinal (métagénomique) est envisagée, des dosages d'acides gras à chaîne courte (SCFA) et d'hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (GLP-1, CCK, PYY) ainsi que des analyses transcriptomiques sont également prévues pour compléter le classement des variétés de chicorée en tant que prébiotiques. Deux génotypes, présentant les contenus les plus contrastés en inuline et composés phénoliques, seront utilisés dans cette étude et représenteront les indicateurs suffisants dans cette étape pour observer des réponses de l'organisme animal, ce qui permettra une réduction du nombre d'animaux.

L'objectif de ce protocole est de déterminer la faisabilité et la pertinence du test in vivo sur des souris des deux sexes (BALB/cBYj) pour permettre la mise en évidence des effets prébiotiques de la chicorée. C'est pourquoi la demande est faite pour 1 an et une expérimentation de 36 jours. Si les résultats sont concluants un autre protocole plus complet avec plus d'animaux sera déposé. Mais cette première étape nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le nombre maximum de souris sera donc de 42. Au cours des expérimentations, les souris seront suivies plusieurs fois par jour afin d'évaluer leur bien-être et aucun signe de détresse considéré comme point limite ou souffrance sévère ne sera accepté (difficulté respiratoire, prostration, baisse de vivacité, etc.).

**9614** La pneumonie acquise sous ventilation (PAVM) correspond à toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection.

Ses conséquences sont majeures sur la morbidité et la mortalité des patients de réanimation, la consommation d'antibiotiques et la durée d'hospitalisation, notamment en réanimation. Certains dispositifs médicaux sont utilisés dans le but de réduire l'incidence des PAVM. Le principal dispositif médical concerné est la sonde d'intubation et de son ballonnet. Toutes les évolutions qu'a connues ce dispositif ces dernières années font qu'une attention croissante est portée au choix de la sonde d'intubation (et de son ballonnet) dans l'optique de prévenir les PAVM.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'une sonde endotrachéale enduite d'un nouveau composé à activité antimicrobienne (secret industriel) sur la colonisation bactérienne dans la trachée, le poumon et sur la sonde.

Le Remplacement du modèle in-vivo est limité par les difficultés d'accès au poumon en recherche clinique, et des résultats limités obtenus avec un modèle in vitro sur cellules pulmonaires étirées, qui ne permet pas de reproduire l'infection, ni d'évaluer un système d'intubation.

Le lapin est un modèle privilégié pour une ventilation mécanique prolongée par les voies naturelles. Dans un objectif de Réduction, le nombre d'animaux choisi (3/groupe) est le nombre minimal déterminé par des études préliminaires pour permettre une analyse statistique intergroupes. Le

nombre de lapins sera de 7 sur 2 mois. Soit un groupe (n=3) intubé avec une sonde enduite, et un groupe témoin (n=3) intubé avec une sonde non enduite. 1 lapin sera utilisé en supplément pour vérifier les paramètres de ventilation et de mise au point de l'infection.

Dans un objectif de Raffinement, chaque procédure (intubation, ventilation, inoculation, autopsie) sera réalisée sous anesthésie générale. Durant toute la procédure, l'animal est maintenu sur tapis chauffant pour éviter une éventuelle hypothermie liée à l'anesthésie. Dans notre modèle, aucune mortalité n'est attendue. Un suivi de la fréquence cardiaque à l'aide d'un appareil dédié (scope) permettra de dépister les variations de fréquence cardiaque et une possible dysfonction d'anesthésie pour y remédier rapidement avec une limite basse de 80 – 100 battements/minute. Au global, s'agissant d'une procédure sous anesthésie générale et n'induisant pas de mortalité ni de détresse particulière, aucun autre point limite n'est quantifiable.

**9615** L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'effet anti-tumoral de l'association d'un inhibiteur de kinases avec un médicament couramment utilisé en cardiologie et ayant fait l'objet d'essais cliniques en cancérologie, la Trinitrine. En effet, des travaux antérieurs réalisés sur des cellules en culture ont révélé que cette association avait la capacité de tuer les cellules tumorales du colon et d'activer le système immunitaire. Des études très préliminaires réalisées chez la souris avec cet inhibiteur de kinases utilisé seul, semblent également montrer qu'il pourrait inhiber la croissance tumorale.

L'intérêt de ce travail est grand puisqu'il devrait conduire à développer une nouvelle thérapie efficace chez les patients porteurs de cancers du côlon métastatiques chez lesquels les traitements actuels restent peu efficaces.

Dans ce projet, nous analyserons la fonction anti-tumorale de l'association de cet inhibiteur de kinases avec la Trinitrine, dans un modèle de cancer du côlon chez la souris. L'implication du système immunitaire sera également testée par l'utilisation d'un agent bloquant les globules blancs. L'identification plus précise des cellules immunitaires intervenant dans cet effet anti-tumoral sera alors réalisée en analysant les cellules présentes dans les tumeurs.

Ces travaux, ne peuvent pas être réalisés sur des cellules en culture ou à partir de méthodes alternatives puisque ce traitement nécessite la présence d'un système immunitaire complet et fonctionnel, d'où l'utilisation de souris.

Ce projet qui va durer 5 ans nécessite l'utilisation de 312 souris Balb/C réparties comme suit :

(1) l'étude de l'efficacité anti-tumorale de l'association de l'inhibiteur de kinases et de la Trinitrine nécessite l'utilisation de 240 souris, pour dans un premier temps tester deux protocoles de traitement et ensuite choisir le meilleur pour tester l'implication du système immunitaire. La première partie de ce projet nous servira donc à choisir le protocole de traitement adapté ce modèle et ainsi permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

(2) l'étude des modifications immunitaires des tumeurs nécessite 72 souris qui recevront le protocole de traitement déterminé dans la première partie de l'étude. Ces expériences devront être réalisées trois fois pour l'obtention de résultats statistiquement.

Les résultats préalablement obtenus nous permettent de réduire les groupes d'animaux à 5 individus par groupe, en répétant trois fois les expériences pour les expériences de suivi tumorale et à 3 individus par groupe en répétant trois fois les expériences pour la détermination des modifications immunitaires des tumeurs.

L'hébergement des souris se fera en groupe pour éviter le stress. Du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni et le calme sera maintenu tant que possible dans la salle d'hébergement. Les lignées de cellules tumorales murines CT26 seront injectées dans le flanc de souris anesthésiées, par voie sous-cutanée. Les différents traitements seront administrés par voie intrapéritonéale et sous-cutanée. Les animaux seront suivis tous les 2-3 jours pour vérifier leur bien-être et déterminer la progression tumorale par mesure du volume de la tumeur. En cas d'apparition de nécrose ou d'autres signes de souffrance (ex : volume de la tumeur trop important, perte de 10% du poids de la souris), les animaux seront mis à mort.

**9616** Le mycosis fongoïde (MF) et le syndrome de Sézary (SS) sont les deux principaux sous-types de Lymphome T Cutané Epidermotrope (LTCE). Le taux d'incidence annuelle est de 1/100000. Le MF correspond à un infiltrat dermique monoclonal de lymphocytes T CD4+. La maladie débute par une

atteinte exclusivement cutanée, sous forme de plaques non infiltrées, qui évoluent vers des plaques infiltrées, des lésions tumorales et enfin vers une érythrodermie.

Elle peut prendre une forme leucémique appelée syndrome de Sézary. Dans les stades avancés, le pronostic est mauvais : la survie à 5 ans est de 20%. La prise en charge thérapeutique n'est pas standardisée et les traitements actuels ne permettent qu'une rémission de courte durée. Récemment, le brentuximab-vedotin (BV), un anticorps monoclonal anti-CD30 conjugué à une drogue (la monométhylque auristatine E, MMAE) a montré une efficacité dans le traitement des MF réfractaires, mais l'expression de CD30 à la surface des cellules tumorales est variable. Le BV ne montre qu'une efficacité, transitoire, chez 70% des patients. Les LTCE représentent donc un défi thérapeutique.

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 de réaliser des tests précliniques chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de leurs composés thérapeutiques innovants les plus prometteurs. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales humaines à des souris immunodéficientes à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Nous utiliserons la méthode des 3R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle in vivo sera remplacé par des modèles in vitro. Nos études seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des drogues sur le développement tumoral. Si nécessaire, des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 12) afin de s'assurer de leur bonne tolérance à ces molécules et d'adapter les doses à administrer à notre souche de souris. Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité sur au moins 2 modèles différents de xénogreffes de LTCE. Pour mener ces tests d'efficacité, au maximum 4 groupes de 8 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé et un groupe contrôle positif recevant le BV. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux et lorsque possible, ces groupes contrôles seront commun à plusieurs tests d'efficacité. De même, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse et l'imagerie par bioluminescence. Les procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Enfin, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 4 à 5 afin d'éviter le stress de l'isolement. Pour ce projet qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du LTCE, nous avons estimé pouvoir gérer au maximum 4 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 2220 souris.

## 9617

Améliorer l'efficacité thérapeutique des traitements anticancéreux actuels tout en limitant les effets secondaires est une préoccupation majeure en cancérologie.

Un des axes de recherche développé dans cet objectif est la fabrication de systèmes moléculaires pouvant être activés directement au sein de la tumeur. Ce ciblage va permettre de concentrer l'effet thérapeutique directement au niveau de la cible du médicament (la tumeur) et d'en limiter l'impact sur les tissus sains.

Le système que nous avons développé est une sonde théranostique c'est-à-dire capable à la fois d'être détectée par imagerie in vivo et d'induire une action thérapeutique après administration.

Sa particularité est de pouvoir être déclenchée par un stimulus externe : on va donc pouvoir contrôler son effet dans le temps pour initier l'effet pharmacologique au moment idéal. La sonde sera déclenchée par des rayonnements de type X ou gamma d'énergie similaire à ce qui est utilisé chez l'Homme pour les traitements par radiothérapie, ce qui en fait un outil adapté à l'utilisation en clinique. Lors du déclenchement par rayonnements, la sonde va causer des "trous" dans les membranes des cellules cancéreuses. Ces trous peuvent directement détruire les cellules et/ou laisser entrer les principes actifs qui seraient administrés après le traitement avec la sonde.

Cette approche est unique et ouvre des perspectives très prometteuses pour le traitement de tumeurs résistantes aux chimiothérapies classiques ou à la radiothérapie.

La sonde a subi de nombreux tests pour valider sa structure et vérifier son efficacité *in vitro* sur cellules cancéreuses. Il est maintenant indispensable de passer sur l'animal pour vérifier l'efficacité de la sonde dans un organisme vivant intégré et autonome.

L'objectif de la présente étude est, dans un premier temps, d'évaluer la distribution de la sonde après administration chez une souris porteuse d'une tumeur cérébrale. Cette étude préliminaire doit nous permettre de vérifier que la sonde injectée chez l'animal atteint bien la tumeur, point crucial pour l'utilisation thérapeutique de la sonde.

Dix souris seront nécessaires pour la réalisation de cette étude.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

Leurs conditions d'hébergement sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

**9618** Les salmonelles sont responsables, suivant leur hôte, de pathologies très différentes allant de la fièvre typhoïde à la gastroentérite en passant par le portage asymptomatique. La principale source de contamination humaine dans les pays industrialisés est les volailles contaminées. Chez les volailles, la majorité des sérotypes de salmonelles (*Typhimurium* et *Enteritidis*) induisent un portage asymptomatique qui correspond à une infection systémique transitoire et à une persistance de la bactérie dans les caeca accompagnée d'une forte excrétion fécale sans trouble pour l'animal.

Les mécanismes à l'origine de ce portage sont très mal connus. Ils font intervenir de nombreux facteurs : bactériens (facteurs de virulence), de l'hôte (facteurs immunitaires), de la flore intestinale et de l'environnement. L'existence de recontaminations entre animaux est connue et nous avons montré récemment qu'elles jouaient un rôle capital dans l'établissement du portage. Pour démontrer cela nous avons développé deux modèles d'infection des poussins par *Salmonella* : un modèle en isolateur où les recontaminations entre animaux sont très faibles et un modèle plus conventionnel, en cage, où les recontaminations entre animaux sont fortes. Les premiers résultats suggèrent que le portage de *Salmonella* est lié à la présence d'animaux super-excréteurs qui recontaminent les autres animaux plus résistants à une première infection. L'objectif de ce projet est d'identifier les facteurs bactériens, de l'hôte et de sa flore intestinale qui sont responsables de l'infection et du statut "super-excréteur" ou "résistant" des poussins suite à une première inoculation. Nous étudierons également le rôle de ces facteurs dans la transmission entre animaux. Le projet inclut des infections en isolateur et des infections en cage. Dans ces deux modèles, des animaux jeunes (entre 1 et 7 jours) sont inoculés avec une suspension de salmonelles. La colonisation est contrôlée par des prélèvements réguliers et individuels de fientes. L'inoculation préalable de vaccins ou de drogues capables de moduler les facteurs de l'hôte ou le microbiote intestinal est prévue. En fin d'étude les animaux sont autopsiés et des dénombrements bactériens sont réalisés dans les organes cibles (rate, foie, caeca, intestin). Des prélèvements de sang sont possible dans certaines expériences. En fonction du modèle et du paramètre étudié, la durée d'expérimentation varie entre 3 et 35 jours post-inoculation. Quatre expériences par an sont planifiées afin de tester les différents paramètres qui pourraient être impliqués et les actions de contrôle. L'étude du portage asymptomatique de *Salmonella* chez les volailles n'induit pas de douleur chez l'animal supérieure à l'introduction d'une aiguille. La règle des trois R est appliquée :

Remplacement : l'étude du portage bactérien ne peut se faire que par le biais d'étude *in vivo* sur animaux cible.

Raffinement : en fonction des avancées techniques, il pourra être envisagé de suivre la colonisation des organes par les techniques d'imagerie *in vivo*.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé, et dans la mesure du possible, une caractérisation préalable des gènes bactériens et de la réponse de l'hôte est réalisée *in vitro* sur lignée cellulaire pour permettre la sélection des gènes les plus pertinents.

Le nombre de poussins à utiliser par expérimentation est fixé en fonction du test statistique. Dans les cinq années à venir, le projet utilisera environ 2330 poussins.

**9619** Ce projet a pour but de développer une méthodologie qui permettra l'évaluation préclinique des nouvelles technologies d'assistance à la chirurgie mini-invasive, et plus spécifiquement, les instruments robotisés et l'assistance robotisée ou télémanipulation.

L'assistance robotique connaît un essor considérable depuis les dernières années, et suscite un nombre croissant de projets de développement dont la validation préclinique est un prérequis incontournable. Ce projet s'inscrit dans cette courbe de croissance.

Cette méthodologie sera appliquée principalement à l'assistance en chirurgie abdomino-pelvienne, mais pourra être étendue à d'autres applications de chirurgie mini-invasive.

La chirurgie mini-invasive est réalisée avec un nombre variable de points d'accès (incision et trocar) à l'espace de travail considéré, comme la cavité abdominale ou thoracique. Classiquement, le nombre d'accès détermine le nombre d'instruments qui peuvent être utilisés dans l'espace de travail. Récemment, de nouveaux développements tendent à utiliser plusieurs instruments introduits par un seul accès : c'est la chirurgie mini-invasive par incision unique. Dans l'un et l'autre format, des instruments robotisés peuvent faciliter la chirurgie.

L'assistance robotique proposée sous la forme de « plateforme » suit la même évolution, certains dispositifs utilisant plusieurs accès, d'autres, plus récents, visant à n'en utiliser qu'un.

L'utilisation de plusieurs points d'accès, et instruments, permet de produire une triangulation des instruments chirurgicaux qui facilitent la réalisation de tâches complexes, comme la dissection et la suture des tissus. C'est le cas pour le robot chirurgical « Da Vinci », la référence actuelle et le plus utilisé. Ses performances ont stimulé le développement de concepts comparables qui ont, ou nécessitent, une validation préclinique.

La chirurgie mini-invasive classique par incision unique est plus complexe, notamment par le challenge que représente la création d'une triangulation des instruments qui sont introduits par un accès unique. L'assistance robotique a probablement un rôle important à jouer pour résoudre ce challenge de l'incision unique.

Ce projet permettra d'évaluer les caractéristiques technologiques des instruments et plateformes d'assistance robotisée pour la chirurgie par accès unique et par accès multiples, grâce à réalisation de procédures chirurgicales variées et systématisées au cours desquelles les paramètres suivants seront étudiés :

- sécurité et efficacité du système
- validité, par comparaison aux systèmes d'assistance robotisée existants
- facilité d'utilisation (pour une formation efficace des médecins et des équipes chirurgicales)

Ces paramètres permettront d'acquérir les données essentielles avant la mise en route des essais cliniques et la soumission aux organismes réglementaire en vue de l'obtention du marquage CE et de l'autorisation FDA.

Cette évaluation sera initiée par une étude des caractéristiques/performances sur des modèles inanimés (mannequins, pièce anatomique, cadavre) et sera complétée par une étude de validation sur des modèles précliniques, utilisant le model porcin. Cette dernière phase permettra de recueillir les données précliniques indispensables, sécurité-efficacité, taille et positionnement optimal des instruments chirurgicaux, capacité de manipuler, disséquer, rapprocher et suturer les tissus vivants de manière sûre et efficace

Ce projet comportera deux types d'études. Le nombre total d'animaux inclus sera réparti dans les différents sous-projets correspondant à l'évaluation d'autant de solutions technologiques.

1. Etudes sans survie, incluant 60 animaux, pour évaluer la faisabilité/efficacité/sécurité de diverses procédures chirurgicales abdomino-pelviennes utilisant les différentes modalités techniques.

2. Etudes avec survie de 10 jours, incluant 40 animaux, pour évaluer la qualité de la réhabilitation et de la cicatrisation post opératoire après les procédures chirurgicales mentionnées.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Ce projet sera initié par une étude des caractéristiques/performances sur des modèles inanimés (mannequins, pièce anatomique, spécimen humain). Cependant, pour tester la sécurité et l'efficacité (temps de procédure, complications) du dispositif en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser et d'évaluer des dispositifs de chirurgie hybride conçus pour un usage chez l'homme.

Réduction : il s'agit d'une étude pilote pour chacun des dispositifs testés. Le nombre de procédures chirurgicales réalisées sur chaque animal et le nombre d'animaux utilisés ont été optimisés pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 100 porcs représentent un nombre nécessaire et suffisant. Enfin toutes les procédures seront réalisées par des chirurgiens experts, ou par des chirurgiens novices encadrés par des mentors qui maîtrisent à la fois les procédures et l'anatomie porcine.

Raffinement : Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs, des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

**9620** Les recherches menées sur les espèces animales traditionnellement étudiées en cognition (certains singes, certains oiseaux, les rongeurs) font tomber les barrières établies entre l'homme et les animaux et démontrent que certains animaux possèdent des capacités cognitives dites de « haut niveau ». Ces recherches ont largement contribué au débat sur la place de l'animal dans notre société. En effet, l'attribution de capacités cognitives à des animaux est directement liée à la façon dont l'animal sera considéré et utilisé. A ce jour, très peu d'études sur les capacités cognitives de haut niveau ont concerné des espèces de rente.

L'objectif de notre projet est donc de développer et d'adapter à des espèces de rente une méthodologie validée en cognition comparée basée sur le test de reconnaissance différé ou matching to sample test (MTS) pour aller questionner l'existence de plusieurs fonctions cognitives dites de haut niveau comme la mémoire de travail, la capacité à catégoriser des items ou la métacognition (capacité d'un individu à estimer le niveau de ses connaissances). Ces capacités cognitives seront étudiées, en utilisant la même méthodologie, chez quatre modèles d'animaux de rente afin d'avoir une approche comparée. Deux modèles de mammifères domestiques ont été sélectionnés, le cheval, pour lequel une littérature sur la cognition existe déjà, et le mouton, qui permettra à terme des études neurobiologiques visant à élucider les mécanismes qui sous-tendent ces fonctions cognitives. Ces capacités cognitives seront aussi étudiées chez la poule domestique et la truite arc-en-ciel, deux espèces emblématiques des productions avicoles et piscicoles. Le présent projet concerne le volet relatif à l'étude des capacités cognitives de la truite arc-en-ciel. Le principe du MTS est fondé sur des blocs successifs de deux essais : Lors d'un essai  $n$ , un item (visuel, par le biais d'un écran) est présenté à l'animal. Lors de l'essai suivant ( $n+1$ ), deux items (ou plus) sont présentés à l'animal : celui qui lui a été présenté à l'essai  $n$  et un (ou plusieurs) autre(s) item(s). Pour obtenir une récompense (aliment) l'animal doit retrouver l'item présenté à l'essai  $n$ . Nous adapterons des systèmes de « self-feeder » déjà utilisés en pisciculture et commercialisés. Ce dispositif permet au poisson d'actionner une tige immergée déclenchant un détecteur de micro-mouvement, actionnant à son tour la libération de granulés. Les truites apprennent très vite ce type de conditionnement opérant. Nous envisageons de placer ce dispositif devant une paroi transparente du bassin où l'on positionnera l'item visuel qui, s'il est choisi, permettra l'obtention de la récompense alimentaire. Après la première alimentation (2 mois post-fécondation), nous utiliserons un total de 75 truitelles parmi lesquelles 10 individus seront sélectionnés et testés au final. La sélection sera faite à 4 mois lors d'un test d'apprentissage spatial en T-maze. Les 30 truites les plus rapides à rejoindre la zone récompensée seront gardées pour la suite.

Ce projet respecte la règle des 3Rs :

Remplacer : il n'est pas possible d'étudier les capacités d'apprentissage autrement que sur des animaux vivants.

Réduire : le nombre d'individus testés est minime ( $n=10$ ). Il est suffisant puisque nous entraînerons les mêmes individus tout au long de leur vie (4 ans). Les autres individus auront permis une première sélection et serviront à augmenter la densité dans les bacs.

Raffiner : les animaux seront élevés dans les meilleures conditions possibles de façon à maximiser leur compétence cognitive. Aucun stress ne sera appliqué, les animaux vivront dans des bacs enrichis



(plantes, cachettes) à une densité optimale (la composition du groupe restera inchangée) et les paramètres physico-chimiques de l'eau seront optimaux.

**9621** L'objectif de ce projet est de développer un agent présentant à la fois une activité anti-tumorale et la capacité d'être suivi par imagerie. En effet, cette dernière décennie a vu le développement de thérapies anti-cancéreuses basées sur l'utilisation d'anticorps, activant le système immunitaire et ainsi éliminant les cellules cancéreuses. Ces traitements bien que montrant des résultats très intéressants chez les patients atteints de cancer métastatique, ne sont cependant efficaces que sur 1/3 de la population. Ce projet a deux buts qui sont (1) de développer un biomarqueur (anticorps visualisable par microscopie optique) permettant de cibler les patients répondeurs à ces nouvelles thérapies et (2) d'associer à ce nouvel agent une molécule cytotoxique à base de métal capable de tuer les cellules cancéreuses.

Cette double thérapie devrait permettre d'obtenir un traitement plus efficace tout en conservant une bonne sélectivité.

Ces travaux, ne peuvent pas être réalisés sur des cellules en culture ou à partir de méthodes alternatives puisque nous cherchons à visualiser la présence de la cible de notre traitement dans la tumeur de l'animal entier et que ce traitement nécessite la présence d'un système immunitaire efficace.

Ce projet qui va durer 5 ans nécessite d'utiliser 1044 souris Balb/C ou C57Bl/6 réparties comme suit : (1) La mise au point du biomarqueur visualisable nécessite l'utilisation de 54 souris qui permettront d'identifier le meilleur agent visualisable dans la souris entière. Pour obtenir des résultats robustes ces expériences devront être réalisées sur des groupes de 3 souris, avec différents agents visualisables (et leur contrôle) et réalisées trois fois pour obtenir des données statistiquement significatives.

(2) La détermination de l'effet anti-tumoral du cytotoxique nécessite 900 souris, qui seront réparties en 2 groupes (contrôles versus traitées) de 5 souris. Cinq molécules métalliques élaborées par une équipe de chimistes et testées préalablement sur des cellules tumorales en culture (2 lignées de cellules de cancer du côlon, 2 lignées de cancer du sein, 1 lignée de cancer du poumon et 1 lignée de mélanome) seront testées chez la souris syngénique de ces différents modèles. Pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs ces expériences devront être réalisées trois fois, comme nous l'ont démontrées les précédentes études. Les résultats obtenus à partir de ces expériences nous permettront de sélectionner la molécule cytotoxique à utiliser dans l'expérience suivante.

(3) La création de l'agent thérapeutique visualisable et cytotoxique nécessite 90 souris, qui seront réparties en 3 groupes (contrôle visualisable, agent sans cytotoxique mais visualisable, agent avec cytotoxique et visualisable) de 5 souris. Deux lignées tumorales différentes seront testées en fonction des résultats obtenus lors du point (2). Pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs ces expériences devront être réalisées trois fois, comme nous l'ont démontrées les précédentes études.

L'hébergement des souris se fera en groupe pour éviter le stress. Du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni et le calme sera maintenu tant que possible dans la salle d'hébergement. Les différentes lignées de cellules tumorales murines seront injectées dans le flanc de souris anesthésiées, par voie sous-cutanée. Les différents traitements seront administrés par voie intrapéritonéale et intraveineuse. Les animaux seront suivis tous les 2-3 jours pour vérifier leur bien-être et déterminer la progression tumorale par mesure du volume de la tumeur. En cas d'apparition de nécrose les tumeurs seront traitées avec une crème cicatrisante, si la nécrose dépasse 2 mm de diamètre ou si la taille de la tumeur dépasse 1500 mm<sup>3</sup> ou si d'autres signes de souffrance apparaissent (ex : perte de 10% du poids de la souris), les animaux seront mis à mort.

**9622** Le syndrome de défaillance multiviscérale, fréquemment rencontré en réanimation, est caractérisé par la décompensation simultanée ou consécutive d'au moins deux organes. C'est la conséquence ultime d'agressions ischémiques systémiques, comme l'arrêt cardiaque réanimé, ou les suites d'interventions chirurgicales cardiovasculaires ou digestives majeures. Plus de la moitié des patients atteints de ce syndrome décèdent à l'heure actuelle. Les conséquences lésionnelles, liées en

particulier à la réaction inflammatoire, peuvent être limitées si une hypothermie ultra-rapide est mise en place précocement au décours de l'agression ischémique, avant « l'installation » de défaillance multiviscérale. L'un des initiateurs supposés de cette réaction inflammatoire est la libération précoce de substances relarguées par les cellules mortes après l'ischémie. Ces substances sont appelées Damage Associated Molecular Pattern molécules (DAMP). Dans notre travail, nous proposons de déterminer la cinétique de libération de ces substances pour comprendre la « fenêtre » d'action des nouvelles approches thérapeutiques.

Dans ce contexte, le but de ce projet est d'évaluer le rôle de DAMP pro-inflammatoires (HMGB1, PS100B, IL1- $\alpha$  et IL33) dans l'effet protecteur de l'hypothermie dans deux conditions de défaillance multi-viscérale chez le lapin, c'est-à-dire après un arrêt cardiaque ou ischémie abdominale. Ces deux situations sont assez différentes puisqu'après un arrêt cardiaque réanimé, ce sont principalement les dysfonctions cérébrale et cardiaque qui dominent alors qu'après une ischémie abdominale, ce sont des lésions rénales, hépatiques et digestives qui sont observées.

L'utilisation des modèles animaux est indispensable dans la recherche en physiopathologie compte tenu de la complexité des interactions « inter-organes », qui ne peuvent pas être reproduits ex vivo actuellement (pas de remplacement possible). Pour conduire cette étude, nous avons cherché à réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire en multipliant le nombre de paramètres biologiques évalués (réduction) et calculé statistiquement le nombre d'animaux le plus faible pour pouvoir répondre à la question de recherche posée. A toute les étapes susceptibles d'être à l'origine d'une douleur, les animaux feront l'objet d'une anesthésie ou d'une analgésie avec des antalgiques puissants (Raffinement). Nous utiliserons ainsi 150 lapins sur une période de 3 ans. Les conditions d'hébergement des animaux correspondent aux normes en vigueur.

**9623** Le glaucome à angle ouvert correspond à une altération des fibres nerveuses de la tête du nerf optique (papille) liée à l'âge, responsable d'une détérioration irréversible du champ visuel pouvant conduire à la cécité. Les glaucomes représentent la seconde cause de cécité dans le monde. Il se trouve dans la plupart des cas favorisé par une Pression Intra Oculaire (PIO) élevée. Les traitements actuels disponibles visent principalement à réduire la PIO en diminuant la sécrétion de l'humeur aqueuse et/ou en facilitant son évacuation de la chambre antérieure de l'œil. Ces traitements présentent néanmoins des problèmes de tolérance et d'efficacité à long terme. Des travaux récents ont proposé que les vaisseaux lymphatiques, présents au niveau oculaire, puissent constituer une nouvelle voie de drainage de ce fluide.

Lors d'une précédente étude, nous avons mis en évidence le rôle crucial d'une protéine, la BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) dans le développement et la maturation des vaisseaux collecteurs lymphatiques, ayant un impact fonctionnel sur l'efficacité du drainage lymphatique. Une autre protéine, la VE-cadhérine s'est révélée essentielle dans la régulation de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques et donc le passage des fluides. Cette fonction apparaît associée à une modification particulière (une phosphorylation) sur une position bien spécifique dans la séquence de cette protéine.

Ainsi cette étude vise à approfondir les rôles potentiels de la BMP9 et de la mutation dans la séquence de la protéine VE-cadhérine sur le fonctionnement des vaisseaux lymphatiques de l'œil, en particulier sur leurs effets dans la régulation de la pression intraoculaire. Les travaux seront réalisés sur un total de 128 souris. Les répercussions de ces mutations sur la régulation de la pression intra oculaire seront analysées avant et après induction d'un glaucome expérimental réversible par un traitement laser, à deux moments de la vie : à la fin du développement des structures oculaires impliquées (2 à 3 mois d'âge) et chez l'individu vieillissant (10 à 11 mois d'âge). En parallèle, et dans le but de disposer d'un contrôle positif, une partie des animaux recevra un traitement couramment utilisé pour diminuer la pression intra oculaire à travers la voie uvéosclérale. La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R.

Pour chaque groupe d'étude, le nombre d'animaux sera réduit à 8, qui est le nombre minimum nécessaire afin de pouvoir mesurer de façon fiable la pression intra oculaire compte-tenu : 1) de la variabilité interindividuelle ; 2) les risques d'opacification cornéenne et de cataracte qui peuvent être engendrées par les protocoles expérimentaux ; 3) des directives d'utilisation des animaux dans la recherche en vision et ophtalmologie interdisant de travailler sur les deux yeux d'un même animal.

Chaque procédure sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. A cette fin, des anesthésiques couplés à des analgésiques seront utilisés lors de l'induction du glaucome expérimental et de la mesure de la pression intra oculaire. L'unité dans laquelle le projet sera réalisé dispose d'une Structure chargée du Bien-Etre Animal qui veillera et aidera les expérimentateurs à améliorer les conditions de réveil après anesthésie.

Enfin il ne nous est pas possible de remplacer l'animal par un autre modèle. L'œil est un organe très complexe composé de structures neuronales et non neuronales, elles-mêmes associées à des éléments des systèmes vasculaire et lymphatique. Le fonctionnement coordonné de toutes ces structures assure la fonction globale de sécrétion et élimination de l'humeur aqueuse. Seule une étude macromorphologique du globe oculaire sur un modèle animal peut rendre compte des paramètres évalués.

**9624** La vaccination reste le meilleur moyen de lutter contre les maladies infectieuses. Les adjuvants vaccinaux sont indispensables à l'efficacité de très nombreux vaccins. Il existe un besoin de développer des adjuvants et des agents vaccinaux administrés par voie respiratoire qui permettront de prévenir les infections respiratoires de façon plus efficace que ceux administrés par voie systémique.

Ce projet a pour objectif d'explorer des nouveaux adjuvants à utiliser dans des vaccins administrés au niveau de la muqueuse respiratoire. Cette exploration sera réalisée dans un modèle de souris instillées par voie respiratoire avec l'antigène KLH (une hémocyanine de mollusque qui est connue par sa forte immunogénicité). L'évolution, tant quantitative que qualitative, de la réponse anticorps spécifiques de l'antigène sera particulièrement étudiée en différentes formulations de KLH, notamment en présence d'adjuvants connus et d'autres à explorer comme les nanoparticules.

Dans ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Par rapport au remplacement, la mise en place d'une réponse immunitaire est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé *in vitro*. Nous utilisons donc un modèle de souris C57BL/6 qui est un animal très utilisé dans notre laboratoire et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle (mesure de la production d'anticorps, recrutement et activation de leucocytes). Nous avons estimé un nombre de 300 animaux pour les 3 années de durée du projet. Ce nombre a été calculé pour avoir 5 souris par groupe avec des expériences de 4 groupes (20 souris par expérience). Les expériences seront effectuées au maximum 5 fois par an. L'estimation du nombre de souris nécessaires a été possible grâce à l'expertise de l'équipe dans l'immunisation à la KLH par voie intra-péritonéale.

Pour ce qui concerne le raffinement, le transport de souris sera effectué par un transporteur agréé et par la suite les souris seront hébergées dans des cages propres (2-6 souris par cage) sur portoir ventilé dans une salle réservée à l'hébergement. Comme mesure d'enrichissement de l'environnement de la cage nous mettrons du coton type Carfil. Une période d'acclimatation (au moins de 7 jours) sera respectée avant le début du protocole. L'administration de KLH et d'adjuvant par voie respiratoire et le prélèvement du sang sur le plexus veineux rétro-bulbaire, seront effectués sous anesthésie générale (mélange d'anesthésique et antalgique) pour réduire la douleur et la souffrance aux souris. Suite au prélèvement du sang, l'animal sera mis à mort pour l'analyse de la réponse immunitaire contre la KLH. Après le premier jour de traitement, les souris seront observées quotidiennement et pesées au moins trois fois par semaine. Les points limites seront les suivants : motricité réduite, apparence physique anormale, perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial. Si un des points limites est atteint, les animaux seront mis à mort dans les 24h. Le protocole aura une durée de 20 jours.

**9625** En 2012, le cancer du sein fait partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate, du poumon et du colon. Actuellement le traitement du cancer sein repose sur l'utilisation du 5-Fluorouracile administré en association avec d'autres chimiothérapies. Bien que ces chimiothérapies aient un effet anti-tumoral avéré, elles ne conduisent pas systématiquement à une rémission totale du patient, en particulier dans les cas de cancers avancés. Il a récemment été montré que la modulation du système immunitaire pouvait être utilisée pour traiter le cancer. Ceci est illustré

par les rémissions impressionnantes de patients atteints de cancer de la peau avancés ou de cancers pulmonaires traités avec des nouvelles thérapies impliquées dans l'activation des globules blancs. Cependant plus de 60% des patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements, ce qui nécessite la compréhension des événements moléculaires impliqués dans cette résistance des cancers à l'action du système immunitaire. L'objectif de ce projet est donc d'étudier la réponse immunitaire dans un modèle murin de cancer spontané mimant la survenue d'un cancer chez l'homme.

Pour cela nous travaillerons avec des souris femelles qui développent spontanément des tumeurs mammaires à l'âge d'environ 3 mois. Nous isolerons les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs et nous analyserons l'expression de molécules indiquant leur activité. Nous étudierons aussi leur état de fonctionnalité. Nous traiterons ces animaux avec divers agents immunomodulateurs puis nous effectuerons des suivis de croissance tumorale. Nous développerons également un modèle de cancer mammaire spontané pour lequel une protéine exprimée par les cellules immunitaires sera supprimée. Ceci nous permettra d'étudier l'implication de cette protéine dans l'activité anti-tumorale des cellules immunitaires. La mise en œuvre de ce projet permettra d'une part de rendre compte de l'efficacité des traitements immunomodulateurs novateurs dans ce modèle et de mettre en lien leur effet anticancéreux avec l'état d'activation et/ou d'épuisement des cellules immunitaires. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 224.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Les modèles de cancer spontanés miment la progression de la maladie chez l'homme et ils permettent donc de conclure sur l'efficacité de notre approche thérapeutique en utilisant un nombre plus limité d'animaux qu'en utilisant des modèles traditionnels. Nous avons ainsi choisi de réduire le nombre d'animaux dans notre projet en ne répétant les expériences que deux fois au lieu de trois, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Une grande partie des mécanismes moléculaires que nous étudierons in vivo seront étudiés in vitro, sur des cellules en culture ce qui permet de limiter au maximum d'animaux utilisés dans le projet (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injections) sera réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum et ainsi permettre le raffinement de notre étude.

**9626** La thématique globale du présent projet porte sur la compréhension des mécanismes physio(patho)logiques impliquant le récepteur nucléaire FXR dans l'homéostasie énergétique. Le récepteur nucléaire FXR est un facteur de transcription agissant tel un senseur métabolique permettant à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique et le métabolisme glucidique, lipidique ou des acides biliaires. Il est d'ailleurs exprimé dans les tissus importants d'un point de vue métabolique (foie, tissu adipeux, muscle, pancréas, cerveau, intestin) et des anomalies dans la fonction de ce récepteur sont à l'origine de perturbations métaboliques. L'homéostasie énergétique, résultant d'une balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique, est régulée par le système nerveux central et par les organes périphériques (foie, tissu adipeux, pancréas, intestin, muscle), nécessitant par ailleurs une étroite communication entre ces différents organes. Aussi, l'objectif global du projet est d'étudier plus avant le rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique en périphérie et au sein du cerveau ainsi que son implication dans la communication inter-organes, par des approches cellulaires (cultures primaires, cultures cellulaires) et intégratives (phénotypage métabolique, histologie, comportement, biochimie, méthodes moléculaires). Ce projet nécessite donc des approches intégrées utilisant des modèles murins d'inactivation tissu spécifique et des approches cellulaires utilisant des cultures primaires (de cellules de foie, d'adipocytes ou de cellules neurales). Ces expériences corrélant des approches moléculaires et métaboliques doivent se faire dans des modèles appropriés in vivo. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre projet sur les 5 ans à venir est estimé à 9780. Notre projet répond aux exigences des 3R à savoir remplacement (utilisation de lignées cellulaires), réduction et raffinement. En effet, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal (un examen clinique sera mis en place afin d'évaluer le plus précisément possible les premiers signes de stress ou de douleur afin d'en limiter les conséquences (en excluant l'animal de l'étude en s'assurant d'avoir le nombre suffisant pour l'analyse statistique)). Dans le cas de traitements pharmacologiques, seuls les composés ayant

démontré leur innocuité seront utilisés. Particulièrement, nous serons attentifs aux paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

-perte de poids de 15% ou plus (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) : - apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.) - changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale, isolement)

-réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane 2%. euthanasies réalisées dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

**9627** L'analyse génomique a montré que de nombreux facteurs liés au système immunitaire (CR1, Trem2,..) intervenaient dans la maladie d'Alzheimer. Si in vitro on peut étudier des paramètres du métabolisme de l'APP sécrétion Abeta 40, sécrétion d'Abeta 42. Il est plus difficile d'observer la formation des plaques amyloïdes et de réaliser des études de comportement. De plus, de nombreux facteurs inflammatoires ont été mis en évidence dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Mais l'étude des paramètres inflammatoires ne peut être réalisée in vitro. Aussi nous nous intéressons à l'influence immunomodulatrice de BPZE1 (vaccin vivant atténué contre la coqueluche) sur le développement de la maladie d'Alzheimer au sein d'un modèle de souris. BPZE1 agit sur différentes pathologies inflammatoires telles que l'asthme ou la dermatite atopique chez la souris. Aussi nous voulons administrer BPZE1 par voie intranasale à des souris PDGFAPP<sup>Swe/Ind</sup> âgées de 2 mois, de 5 mois et de 7 mois et euthanasier toutes ces dernières à 10 mois. Nous savons par expérience que ce modèle présente des plaques amyloïdes à 10 mois. Cette étude portera sur un total de 1980 souris âgées de 10 mois. Afin de respecter la règle des 3Rs nous travaillerons sur les 2 sexes. Pour réduire le nombre, nous effectuons sur un hémisphère les analyses immunohistologiques et sur le second les extractions d'ARN, de protéines. Pour la réalisation de cette étude et afin de réduire le stress et l'anxiété chez nos animaux, les procédures seront espacées de 3 à 7 jours selon la procédure suivante à effectuer. Pour toute procédure invasive ou terminale nous utiliserons des anesthésiques afin d'éviter toute douleur inutile aux animaux. Chaque procédure impliquée dans ce projet a un point limite défini au préalable afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrance (perte de poids, piloérection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement, léthargie, vocalisation anormale, ...). Conformément aux nouvelles directives, pour l'hébergement des animaux dans toutes les cages nous avons mis des maisons à souris afin de limiter le stress. De plus afin de s'assurer du bien-être des animaux, leur état sanitaire est surveillé par des contrôles réguliers.

**9628** La castration des porcs mâles est pratiquée pour pallier la présence de scatol responsable des odeurs de mâle dans la viande de porc. Le scatol est un métabolite du tryptophane (acide aminé apporté par les aliments) dont la dégradation par le foie est inhibée par les androgènes, d'où sa concentration plus importante dans le tissu adipeux des animaux mâles.

La castration chirurgicale à vif n'est plus acceptable dans notre société et incompatible avec la notion de bien-être des animaux d'élevage.

Les représentants européens de la filière porcine ont signé une déclaration auprès de l'union européenne pour tenter de parvenir à l'arrêt de la castration chirurgicale à vif en 2018 à la condition que d'autres solutions efficaces soient trouvées.

Trouver une alternative à la castration chirurgicale qui soit à la fois éthiquement acceptable pour l'animal et la sécurité du consommateur devient donc une évidence.

Par ailleurs, il existe aujourd'hui un vaccin sur le marché mais celui-ci est mal toléré par l'animal et n'offre pas une efficacité sur la totalité des animaux immunisés.

La présente étude vise donc à étudier l'efficacité d'un nouveau type d'immunisation anti-GnRH (gonadolibérine hypothalamique responsable de la synthèse et de la sécrétion des hormones hypophysaire LH et FSH et indirectement des hormones gonadiques) sur 35 porcs mâles d'élevage de race Large White. Le candidat vaccin est constitué d'une protéine recombinante couplée au GnRH et d'un adjuvant sans mercure (émulsion d'acide oléique d'origine végétale). Il devrait permettre

l'immunocastration de porcelets et une seule injection pourrait être suffisante par rapport à l'unique produit sur le marché.

Les axes d'amélioration du vaccin expérimental par rapport à celui déjà disponible sont :

- une meilleure efficacité du nouveau vaccin
- une immunisation obtenue en une seule injection
- une meilleure tolérance du nouveau vaccin, pas d'effets indésirables pour les animaux

L'expérimentation 2016 a montré un bon pouvoir immunogène du vaccin expérimental et une bonne tolérance des animaux immunisés. Néanmoins, la cinétique d'administration des vaccins expérimentaux n'a pas permis le maintien de l'immunisation jusqu'à la date d'abattage des animaux (administration précoce plus éloignée de la date d'abattage et mémoire immunitaire insuffisante).

L'expérimentation 2017 a donc pour but de tester une cinétique d'administration différente et un autre adjuvant, réputé pour générer une meilleure immunisation en amplitude et en durée.

Remplacer : cette étude concerne la validation clinique d'une alternative à la castration chirurgicale du porcelet, elle ne peut en aucun cas être réalisée sur une autre espèce.

Réduire : les tests statistiques utilisés en 2016 ont montré que des groupes de 7 animaux permettent de mettre en évidence le différentiel attendu sur les indicateurs mesurés au cours et en fin d'étude.

L'expérimentation 2017 est prévue sur 35 animaux (5 groupes de 7) soit 5 de moins qu'en 2016.

Raffiner : le contact quotidien avec les agents (habituation) et l'enrichissement (ballons) devrait permettre d'améliorer un peu le bien-être des animaux pendant l'expérimentation. Mise en place de points limites afin de limiter la douleur au maximum.

**9629** Le nombre de victimes de traumatisme crânien, causé par des accidents domestique, sportif ou routier etc, se chiffre en millions de personnes. Durant cette dernière décennie, le nombre de victimes est en augmentation permanente. De nombreuses personnes souffrant de traumatisme crânien ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapées et dans des cas plus graves, décèdent. De plus, il est apparu qu'un grand nombre de personnes présentent des troubles chroniques perturbant leur vie quotidienne. Ces troubles sont dus à la vulnérabilité de l'hippocampe, une structure impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives.

Il est maintenant bien établi qu'au sein de l'hippocampe, de nouveaux neurones sont formés à l'âge adulte. Les objectifs du projet sont d'étudier l'impact d'un traumatisme crânien sur les neurones néoformés et le rôle éventuel de l'Adénosine Triphosphate (ATP) dans la réponse cellulaire.

Ce projet sera réalisé sur des souris génétiquement modifiées exprimant un transgène permettant de visualiser les cellules d'intérêt (souris Nestin\*Ai6). Le projet se divise en trois parties : 1- Nous visualiserons les changements morphologiques chez des mâles et des femelles suite à un traumatisme crânien ; 2- Le projet s'inscrit dans un projet européen dans lequel les types d'anesthésie diffèrent, un paramètre qu'il nous faut contrôler. Aussi nous allons évaluer les conséquences du traumatisme réalisé sous deux types d'anesthésie : gazeuse et par injection d'un anesthésique liquide. Pour cette partie, nous utiliserons uniquement des souris transgéniques mâles. 3- Des études préliminaires laissent supposer que l'ATP pourrait être impliquée dans la réponse cellulaire suite à un traumatisme. Ce qui nous amène à étudier dans une troisième partie le rôle éventuel de l'ATP dans la réponse cellulaire. Cette partie se fera sur des souris transgéniques mâles uniquement. Nous estimons qu'un nombre total de 72 animaux sera nécessaire pour la réalisation du projet. Le projet s'applique à réduire le nombre d'animaux utilisés, de raffiner les approches utilisées afin que le bien-être soit privilégié et nous mettrons en place un suivi des animaux permettant de limiter et traiter leur éventuelle souffrance. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, certains seront utilisés dans plusieurs procédures expérimentales. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives enrichies jusqu'à l'induction du traumatisme crânien où ils seront alors hébergés en cage individuelle enrichie (carrée de coton).

**9630** Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche destiné à identifier de nouvelles molécules permettant de traiter la cirrhose hépatique.

Cette pathologie est définie par l'accumulation excessive de fibrose conduisant à la dégénérescence du foie.

A ce jour, elle est considérée comme irréversible, elle peut se stabiliser ou bien évoluer mais elle ne peut régresser.

L'incidence annuelle de la cirrhose du foie en France est estimée à 150 à 200 cas par million d'habitants avec un nombre de décès d'environ 15000 par an.

C'est une des complications majeures des maladies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine alcoolique, virale, métabolique ou liée à l'exposition à certains médicaments.

La cirrhose constitue un véritable état précancéreux car elle s'accompagne d'une augmentation de la régénération des cellules hépatiques et donc du risque d'altérations génétiques.

Parmi eux, le carcinome hépatocellulaire (CHC) est de loin le plus fréquent et il se développe dans plus de 90 % des cas sur une cirrhose, qu'elle qu'en soit l'origine.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la cirrhose. Aussi, plusieurs voies de recherche et de développement sont en cours pour palier à ce déficit. Afin d'étudier et d'étayer nos hypothèses lors du développement de nos molécules, il nous sera inévitable d'avoir recours à des modèles animaux présentant une pathologie similaire à celle qui se produit chez l'Homme, des méthodes alternatives n'étant pas disponibles à ce jour.

Il existe plusieurs méthodes pour induire expérimentalement une cirrhose hépatique chez l'animal de laboratoire.

Nous utiliserons le modèle de cirrhose hépatique induit par l'administration chronique de diméthylnitrosamine (DMN) chez le rat.

Ce modèle permet le développement d'une cirrhose, pouvant évoluer vers un hépatocarcinome.

Le diméthylnitrosamine elle est principalement rejetée comme sous-produit lors de la production de caoutchouc et de pneus et dans les fumées de tabac.

Aux États-Unis, il est utilisé comme antioxydant et catalyseur dans l'industrie chimique organique.

C'est une molécule considérée comme cancérigène (H301, H330, H350, H372, H411)

Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe modérée et seront réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's

Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. A terme, nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques chroniques, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

Ce projet engagera des rats et dans un nombre estimé à 3960 individus pour la durée que couvrira ce projet.

Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier, avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter individus, les effets désirés.

**9631** Les cellules souches du sang (appelées CSH) sont les cellules qui assurent la production des cellules sanguines (globules blancs, rouges et plaquettes) dont la durée de vie est limitée. Chez l'homme, le processus de fabrication du sang se fait dans moelle osseuse ou sont localisés les CSH (chez la souris il se aussi dans la rate). La dérégulation de ce processus entraîne des maladies telles que les cancers du sang, des ganglions ou de la moelle osseuse. L'une des thérapies indiquées pour traiter ces pathologies est d'éliminer les cellules malades par chimiothérapie ou radiothérapie, puis d'effectuer une greffe des CSH saines pour remplacer les cellules malades restaurant ainsi le

processus normal de fabrication sanguine. En Europe en 2014, il y a 40 000 patients greffés. L'efficacité de la greffe de CSH dépend directement de la quantité de cellules transplantées or ces cellules sont présentes en très petit nombre dans l'organisme. La capacité de multiplier ces cellules est donc un enjeu majeur pour améliorer cette thérapie. A terme, ce projet de recherche améliorera la culture des CSH et ainsi, les thérapies cellulaires pour traiter les maladies du sang.

Chez l'adulte, les CSH se divisent très peu alors qu'au cours du développement embryonnaire elles accomplissent une prolifération massive afin de générer toutes les CSH qui seront présentes chez l'adulte. Les CSH adultes et fœtales ont donc des besoins en énergie qui sont différents. Découvrir comment les CSH fœtales produisent leur énergie pour proliférer durant le développement embryonnaire et ensuite utiliser ces informations pour induire la prolifération des CSH adultes est la stratégie du projet de recherche.

Pour notre projet de recherche, nous collecterons les CSH fœtales qui logent dans le foie fœtal et les CSH adultes qui logent dans la moelle osseuse. Ces cellules seront traitées in vitro puis réinjectées dans des souris hôtes afin de les analyser.

A ce jour, il n'existe aucune lignée cellulaire de CSH, le seul moyen pour obtenir ces cellules c'est à partir de tissu primaire (la moelle osseuse, la rate et le foie fœtal chez la souris), il n'y a donc pas de possibilité de Remplacement.

Pour analyser les CSH il n'existe qu'un seul test, qui consiste à injecter ces cellules dans une souris hôte et regarder comment ces cellules participent à la production des cellules sanguines de cet hôte. En effet pour révéler leur nature, les CSH ont besoin d'être dans leur organe physiologie (dans le foie fœtal, la rate ou dans la moelle osseuse) et à ce jour, il n'est pas possible de recréer cet environnement complexe in vitro, il n'y a donc aucune possibilité de Remplacement.

Dans le respect de la règle des 3R, comme il n'existe pas de possibilité de Remplacement, nous combinerons nos lots témoins dans le but de Réduire le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de Raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance jusqu'à leurs morts (enrichissement de la nourriture lors de l'élevage et de l'expérimentation per se, enrichissement de l'environnement, éviter l'isolement autant que faire se peut, mise en place de points limites pour chaque procédure ...).

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 2600 animaux.

**9632** L'obésité est une maladie associée à une inflammation étant une réaction du système immunitaire. Cet état inflammatoire lié à l'obésité est la conséquence d'une augmentation de l'infiltration de cellules immunitaires dans le tissu adipeux. Toutefois, l'expansion du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité, s'accompagne aussi d'un changement de la balance entre les cellules immunitaires T (= lymphocytes T) anti-inflammatoires et les cellules T pro-inflammatoires. Dans le tissu adipeux viscéral, les cellules T anti-inflammatoires sont très présentes en situation "normale". Elles le sont moins en situation d'obésité. Plusieurs études suggèrent que la diminution du nombre de ces cellules pourrait être un facteur favorisant le processus inflammatoire contribuant au développement des pathologies associées à l'obésité tel que le diabète de type 2. L'activité physique et la restriction calorique sont des stratégies non-médicamenteuses de première intention recommandées dans la réduction de l'obésité et ses complications. Les effets de l'exercice physique observés sur les cellules T pourraient être expliqués par la diminution du tissu adipeux viscéral et sous-cutané, même en l'absence de « perte de poids ». Il est démontré, dans la littérature scientifique existante, l'intérêt inhérent de l'exercice physique et de l'alimentation sur la modification du caractère des cellules immunitaires vers une fonction anti-inflammatoire.

Ce projet a pour objet d'évaluer les effets de stratégies « non-médicamenteuses » sur le métabolisme des cellules immunitaires en particulier des cellules T, en incluant un régime hypocalorique, un protocole d'entraînement et/ou une complémentation de l'alimentation avec de l'acide alpha-lipoïque. La littérature existante nous amènent à penser que l'activation d'un modulateur du métabolisme : le peroxisome proliferator activated receptor beta (PPAR $\beta$ ) est impliquée dans les changements immunitaires, la réponse inflammatoire et les adaptations à l'exercice. Les données existantes montrent une indication à l'administration d'acide alpha-lipoïque ( $\alpha$ -LA) dans un contexte d'inflammation associée à l'obésité. L'apport en  $\alpha$ -LA pourrait compléter les effets bénéfiques de l'activité physique et de la perte de poids afin d'en optimiser leurs effets protecteurs.



Concrètement, l'objectif scientifique est de caractériser les effets de l'alimentation (diminution de l'apport énergétique, alimentation hyperglucidique), de l'exercice physique et de l'apport en agents activateurs de la voie PPAR $\beta$  chez des souris obèses, sur l'inflammation. Cette étude translationnelle permettrait d'apporter des nouvelles indications cliniques dans la prise en charge globale de l'obésité et ainsi prévenir les complications associées. Notre étude aurait un intérêt de santé humaine au vu des bénéfices attendus par ces améliorations immunométaboliques. Nous projetons de soumettre les souris à un régime riche en graisses afin de les rendre obèses puis de les soumettre à une réduction de l'apport calorique. Une partie des souris sera supplémentée en acide  $\alpha$ -lipoïque et/ou en agoniste activateur de PPAR $\beta$  (GW0742) et/ou sera entraînée sur un tapis roulant. Nous mesurerons leur prise alimentaire, leur prise et perte de poids, leur état inflammatoire et nous évaluerons leurs paramètres métaboliques grâce à des systèmes non invasifs (exemple : cages métaboliques). Aucun dommage ne sera occasionné aux animaux. Nous souhaitons utiliser des souris femelles pour pouvoir établir une transposition de nos résultats avec ceux d'une étude clinique qui se fera en parallèle chez des femmes en situation d'obésité. Dans une préoccupation du respect du bien-être animal, dans un souci de réduction, nous vérifierons préalablement l'utilisation des souris femelles (type C57BL6J) par une étude préliminaire (procédure 1). Nous souhaitons en effet valider le fait que ce modèle n'augmente pas la variabilité des paramètres que nous souhaitons étudier. Si tel était le cas, nous utiliserions un modèle de souris mâles afin de ne pas devoir augmenter le nombre de souris nécessaire dans chaque groupe (tout en répondant à l'objectif scientifique). Pour satisfaire au raffinement, le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape de l'expérimentation (habituation à l'exercice physique sur tapis roulant, administration orale des produits et non injectés). Les souris seront suivies quotidiennement par les animaliers et régulièrement par les expérimentateurs afin de détecter au plus tôt tout signe de souffrance et d'y remédier. Sauf exception, les souris seront hébergées en groupe de 3 à 5 dans des cages avec un milieu enrichi (tige de papier et igloo). Remplacement : Nous ne pouvons pas effectuer de remplacement pour ce projet puisque le système immunitaire est un système intégré et complexe qui ne peut être reproduit en culture. Nous estimons que le nombre de souris nécessaire pour mener à bien ce projet et obtenir des résultats statistiquement significatifs, en tenant compte de la règle des 3R, est de 448.

**9633** Le but de ce projet est l'étude d'une population de cellules immunitaires particulières : les macrophages résidents. Ces cellules, comme tous les macrophages, assurent une fonction de protection de l'organisme grâce à leur capacité à phagocyter, c'est à dire à ingérer différentes cibles biologiques, en particuliers des agents infectieux (virus, bactéries, parasites) mais aussi certaines cellules devenues inutiles (cellules vieillissantes ou endommagées) ou dangereuses (cellules cancéreuses). Ils possèdent aussi la capacité de sécréter différentes substances biologiques permettant d'attirer d'autres cellules immunitaires (cytokines) ou de modifier leur environnement tissulaire (enzyme de digestion de la matrice extracellulaire). Toutes ces propriétés en font des agents majeurs dans la réaction inflammatoire, en cas d'infection, mais aussi dans la cicatrisation et la régénération des tissus lésés.

Les macrophages résidents se distinguent des macrophages « classiques » par le fait qu'ils ne sont pas générés par les cellules souches hématopoïétiques qui, chez l'adulte, se trouvent dans la moelle osseuse et produisent, tout au long de la vie, l'ensemble des cellules sanguines.

Les macrophages résidents sont, eux, produits très tôt au cours du développement embryonnaire, dans le sac vitellin, une poche extra-embryonnaire qui entoure et protège l'embryon. Ensuite, rapidement, ces macrophages migrent pour coloniser les différents organes du fœtus (cerveau, peau, poumons, foie, rein, etc...) où ils persisteront après la naissance chez l'individu adulte (d'où le qualificatif de « résidents »).

Au cours de la vie adulte, les macrophages résidents ne sont remplacés que partiellement par ceux générés par la moelle osseuse et de manière très variable suivant l'organe concerné. Par exemple, si les macrophages résidents du poumon sont progressivement remplacés par des macrophages « classiques », ceux du cerveau demeurent presque exclusivement d'origine embryonnaire.

La découverte de l'existence des macrophages résidents étant relativement récente, nos connaissances sur leurs propriétés biologiques demeurent encore incomplètes. Etant donné le rôle majeur joué par les macrophages en générale dans de nombreux processus biologiques (protection

immunitaire, protection contre le cancer, cicatrisation, régénérescence tissulaire), il est important de pouvoir faire la distinction entre les propriétés des deux populations (classiques et résidents). C'est pourquoi nous avons mis en place ce projet dont les objectifs généraux peuvent être regroupés en trois thèmes principaux :

1) Etudier les mécanismes, génétiques et environnementaux, permettant de générer, à partir d'une population unique de précurseurs embryonnaires, l'ensemble des macrophages résidents qui, dans les différents organes adultes, présentent des morphologies et des propriétés variées.

2) Améliorer nos connaissances sur la manière dont les macrophages résidents se multiplient. En effet, malgré l'absence de cellules souches pour la régénérer, cette population est capable de s'auto-entretenir et de proliférer en cas de nécessité comme lors d'une réaction à une infection.

3) Comprendre comment les macrophages résidents participent à la réparation tissulaire. Des études chez la salamandre et le poisson zèbre ont permis d'établir que les macrophages sont nécessaires à la régénération tissulaire (régénération de la queue ou des nageoires). Pendant longtemps, il a été postulé que les macrophages participant à ces processus étaient les macrophages « classiques ». Au regard des nouvelles connaissances sur l'existence de deux populations indépendantes de macrophages dans la plupart des tissus, il est nécessaire de préciser le rôle particulier des macrophages résidents dans la régénération. Pour cela, nous essaierons de caractériser la contribution des deux lignées de macrophages à la réparation tissulaire dans des modèles complémentaires de régénération du foie et de cicatrisation de la peau.

En résumé, si ce projet est avant tout un projet de recherche fondamentale sur la biologie des macrophages, les connaissances qu'il apportera pourront bénéficier, à terme, à des domaines plus appliqués concernant la défense immunitaire ou la réparation tissulaire.

Le recours à l'animal est nécessaire car il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* pouvant se substituer à l'étude directe du système immunitaire *in vivo*. En particulier, les essais *in vitro* sont incapables de reproduire toute la complexité des facteurs impliqués dans les phénomènes de réaction immunitaire ou de réparation tissulaire. De même, la différenciation des macrophages à partir de leurs précurseurs embryonnaires est influencée par des facteurs de la niche fœtale et ne peut pas être reproduite *in vitro* sans artefact.

Un maximum de 2292 souris seront utilisées sur 5 ans (laboratoire de 6 personnes) dans sept procédures de sévérité légère à modérée. Ce nombre a été limité au maximum en tenant compte de la nécessité de produire des résultats interprétables sur le plan statistique. En particulier, nous utiliserons de manière intensive la technologie de cytométrie de flux qui permet l'analyse détaillée des populations cellulaires à partir d'échantillons de tailles millimétriques (organes d'embryons). Ceci, allié à l'utilisation rationnelle de différentes lignées de souris transgéniques permettra de maximiser l'efficacité de nos analyses et de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

Une partie de ce projet repose sur l'analyse d'embryons. La seule procédure faisant l'objet d'une réglementation est l'injection intrapéritonéale de tamoxifène au cours de la gestation, procédure éthiquement agréée et ne présentant qu'une douleur minime pour l'animal, le produit n'étant pas douloureux et n'entraînant pas d'effets délétères.

Pour les études sur réparation tissulaire de la peau, un antalgique local (lidocaïne) sera utilisé avant application de la blessure. Pour le modèle de régénération hépatique, les animaux seront anesthésiés, puis recevront un antalgique jusqu'à deux jours après l'opération.

**9634** Les mutations dans le gène LMNA, codant pour les lamines A et C, ont été associées avec la Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss (DMED), pathologie humaine affectant les muscles striés squelettiques et le cœur. Le but de notre étude est de comprendre le(s) mécanisme(s) pathophysiologique(s) de la DMED en étudiant un des modèles murins de cette pathologie : la souris *Lmna* knockout (*Lmna*<sup>-/-</sup>). Il a été précédemment montré que les mutations dans les lamines conduisent à une désorganisation de la localisation nucléaire associées à une altération nucléaire. Nous émettons l'hypothèse que cette délocalisation/altération physique des noyaux peut être une des causes de la myopathie et nous proposons d'identifier les processus en jeu dans un contexte de formation de fibres musculaires *in vitro*.

2- Procédures et Retombées attendues

Le gène LMNA code pour les lamines A et C, deux filaments intermédiaires qui sont d'importants déterminants de l'architecture nucléaire en interphase. Les mutations dans LMNA ont été associées à un large spectre de maladies humaines dont la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (DMED) qui affecte le cœur et les muscles striés squelettiques. Le mécanisme cellulaire par lequel des mutations de composants de l'enveloppe nucléaire conduisent à des anomalies du muscle strié squelettique reste à ce jour incompris et aucun traitement n'est actuellement disponible.

Différents mécanismes participent à l'altération du positionnement nucléaire le long des fibres. Nous souhaitons donc identifier dans des fibres musculaires formées à partir de myoblastes extraits de souriceaux *Lmna*<sup>-/-</sup>, les moyens de rétablir la localisation nucléaire le long des fibres musculaires.

Remplacement : Seul les conditions de cultures de fibres musculaires *in vitro* à partir de cellules primaires permettent d'obtenir une maturation finale des fibres musculaires très semblables physiologiquement à celle retrouvées dans des muscles *in vivo*. Seul l'extraction de ces progéniteurs musculaires (cellules musculaires primaires) à partir de modèles murin nous permet de pouvoir étudier la formation de ces fibres matures.

Réduction : Un protocole optimisé nous permettra d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement : Des points limites adaptés au modèle ont été définis de façon à éviter toute souffrance inutile des animaux

Nombre de souris : 180

**9635** Notre système immunitaire nous protège constamment vis à vis des agressions des agents pathogènes. Cependant dans certaines situations rares, le système immunitaire se dérègle et initie des réponses immunitaires délétères contre notre corps. Chez l'enfant, l'Arthrite Juvénile Idiopathique (AJI) est une des principales causes de maladie inflammatoire. Cette maladie est responsable d'une inflammation chronique des articulations. Lorsque au sein d'une famille, plusieurs membres sont atteints, nous pouvons suspecter qu'il existe une cause génétique. Grâce aux nouvelles techniques de génétiques, nous pouvons ainsi identifier des mutations dans des gènes qui codent pour des protéines, éléments essentiels au bon fonctionnement de nos cellules y compris celles du système immunitaire. Ainsi, en explorant plusieurs familles avec AJI, nous avons identifié des mutations dans le gène codant pour la protéine LACC1, dont les fonctions n'avaient encore jamais été étudié. Au laboratoire, nous avons démontré qu'elle était présente spécifiquement dans un type de cellule immunitaire, les macrophages. De plus, nous avons montré que nos patients étaient déficitaires en cette protéine. Actuellement, nous développons de nombreux outils afin de démontrer le rôle essentiel de LACC1 dans les macrophages et de comprendre comment son absence peut induire l'AJI. Nous voulons à présent explorer son fonctionnement *in vivo* dans 2 contextes inflammatoires, notamment dans un modèle d'arthrite chez la souris et un modèle d'inflammation intestinale car des variants de LACC1 ont aussi été identifiées dans cette maladie. Ces modèles *in vivo* nous permettront de mieux comprendre le fonctionnement de LACC1 dans un contexte physiologique maintenant le bon fonctionnement de notre système immunitaire et éventuellement proposer des pistes thérapeutiques pour traiter les patients atteints d'AJI.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux. Le nombre d'animaux

est donc estimé à 96 souris sur 2 ans. Tout au long du projet, nous veillerons à ce que les conditions d'élevage, d'hébergement et de soins soient les plus adaptées. La souffrance et l'angoisse de l'animal seront diminuées au maximum. Des analyses *in vitro* seront réalisées en parallèle afin de compléter les résultats obtenus.

**9636** La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une infection virale identifiée pour la première fois au Kenya en 1913. Elle touche principalement les animaux d'élevage (bovins, ovins, caprins...) chez lesquels elle provoque hépatite aiguë et fièvre hémorragique. Chez les ruminants, les jeunes et les femelles gestantes y sont particulièrement sensibles et l'infection entraîne un taux d'avortement proche de 100%. L'épizootie (épidémie atteignant les animaux) de FVR se manifeste donc habituellement d'abord par une vague d'avortements à l'origine de pertes économiques substantielles.

La FVR est aussi une zoonose, c'est-à-dire qu'elle se transmet naturellement des animaux infectés à l'Homme et vice-versa. Chez l'Homme, les personnes infectées développent généralement un syndrome grippal et entrent en convalescence 2 à 7 jours après le début de la maladie. Dans un petit pourcentage de cas (autour de 5%), la maladie évolue vers une forme plus grave avec syndrome de fièvre hémorragique, hépatite, encéphalite ou méningo-encéphalite (inflammation du cerveau et des méninges), ou encore affection de l'œil (rétinite).

Le virus responsable de la fièvre de la Vallée du Rift a été isolé en 1931 au Kenya. Des épidémies ont été observées depuis dans toute l'Afrique subsaharienne. En particulier, une épidémie majeure s'est produite au Kenya, en Somalie et en Tanzanie dans les années 1950-51 entraînant la mort d'environ 100.000 moutons. En 1977, la maladie a touché l'Égypte où environ 200.000 personnes ont été contaminées. Le virus a atteint l'Asie (Arabie Saoudite et Yémen) en 2000, provoquant une issue fatale chez 14% des patients diagnostiqués, et touchant plusieurs îles de l'Océan Indien. Cette présence de la maladie en dehors du continent Africain suscite des inquiétudes quant à la possibilité d'une extension à d'autres parties de l'Asie et à l'Europe.

Malgré les efforts menés, il n'existe actuellement ni vaccin homologué ni traitement antiviral spécifique à la FVR. Dans les cas graves, c'est un traitement symptomatique général qui est utilisé. Les premiers jours suivant l'hospitalisation sont alors critiques pour la survie des patients et l'étendue des séquelles chez les survivants. Nous pensons que le développement de traitements spécifiques à la FVR passe par une meilleure compréhension des caractéristiques de cette maladie. En particulier, nous savons que des facteurs génétiques de l'hôte contrôlent l'issue de la maladie chez l'animal et l'Homme. Pour identifier ces facteurs génétiques, nous disposons d'un modèle murin de l'infection par le virus de la FVR. Ce modèle nous a permis d'identifier une région du génome de la souris qui existe sous au moins deux formes différentes : le virus de la FVR entraîne une hépatite fatale en quelques jours chez les individus portant la première forme, alors que les individus portant la seconde forme survivent.

Notre projet vise à identifier la population cellulaire à l'origine de la différence de sensibilité :

— soit cette population est formée par les cellules du foie proprement dit (hépatocytes) chez lesquelles le virus déclencherait directement une nécrose dont l'importance conduirait à une hépatite fatale chez les individus sensibles.

— soit cette population est formée par des cellules immunitaires originaires de la moelle osseuse qui détruiraient les hépatocytes, déclenchant indirectement l'hépatite fatale chez les individus sensibles. Afin de résoudre l'alternative, nous voulons effectuer des remplacements de moelle osseuse : greffe de moelle osseuse provenant d'individus sensibles chez des individus résistants, greffe de moelle osseuse provenant d'individus résistants chez des individus sensibles. Le phénotype de ces individus lors de l'infection par le virus de la FVR nous permettra de déterminer si le caractère résistant ou sensible à l'infection est corrélé au génotype des cellules hématopoïétiques ou au génotype des cellules hépatiques.

Dans ce projet s'étendant sur 5 ans, nous utiliserons un nombre maximum de 40 souris mâles âgées de 5 à 13 semaines dans une procédure classée sévère. Cette procédure consistera à irradier des souris et leur greffer des cellules hématopoïétiques. Ces souris greffées seront ensuite infectées avec le virus de la FVR. Nous comparerons alors les symptômes présentés par des individus contenant différentes régions d'ADN susceptibles de porter la région responsable de la différence de sensibilité. Les animaux impliqués dans ce projet étant sociaux, ils seront maintenus par groupes de cinq, dans un environnement contrôlé et enrichi, et observés régulièrement pendant l'expérimentation afin d'intervenir dès que les animaux expriment des signes de douleur. Nous tirerons profit de l'expertise que nous avons accumulée depuis plusieurs années sur ce modèle (analyse statistique, manipulation des animaux) pour limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés et réduire tout stress et souffrance induit éventuellement par les procédures. Le recours à l'expérimentation animale est l'unique approche permettant de comprendre les impacts physiopathologiques dans un contexte intégré.

**9637** La sumoylation est une modification des protéines par un petit peptide, appelé SUMO, qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule, et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies humaines à

forte prévalence, telle que la maladie d'Alzheimer ou le cancer, maladies dont la complexité requiert le recours à des modèles animaux - la souris de laboratoire apparaissant comme étant le modèle le plus approprié.

Des données générées au laboratoire indiquent un fort impact de la perte du processus de sumoylation sur la réponse immunitaire, générant notamment une très forte réponse interféron, avec des applications attendues sur la réponse immunitaire anti-tumorale, ce que ce projet vise à étudier. Le rôle global de la sumoylation dans la réponse immune anti-tumorale n'a jamais été étudié. L'immunothérapie des cancers par inhibiteurs de 'check-point' constitue une approche nouvelle et très prometteuse pour traiter les cancers, cependant les taux de succès chez les patients sont encore faibles. Ainsi des approches combinées sont activement recherchées pour améliorer les taux de guérison. Ce projet vise à étudier les effets d'une stratégie combinant les immunothérapies classiques (inhibiteurs de check-point) avec une hyposumoylation, du fait notamment de la forte réponse interféron qu'elle induit. Nos modèles murins pour l'hyposumoylation constituent un outil de choix pour s'atteler à cette problématique. Ce projet, qui étudie une réponse à une thérapie mettant en jeu plusieurs types cellulaires et plusieurs phénomènes différents, nécessite une étude sur l'organisme entier, ce qui impose le recours à des animaux. Il impliquera d'effectuer un certain nombre de croisements entre les souris présentant une hyposumoylation et des souris génétiquement modifiées pour différents modulateurs de la réponse immunitaire.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1200 souris femelles âgées de 8 à 12 semaines, sur 5 ans repartis en 3 procédures modérées.

Ce nombre est le nombre de souris maximum qui sera utilisé pour obtenir des résultats significatifs. Ce nombre pourra être réduit au vu des premiers résultats obtenus. Le test statistique utilisé sera le test student : unpaired-t test.

Les protocoles qui seront utilisés dans ce projet ont été bien établis et publiés dans de nombreuses études.

Ces procédures pouvant engendrer des souffrances pour les animaux, ceux-ci seront surveillés et mis à mort dès qu'ils présentent des signes avérés de souffrance selon la grille de suivi de la douleur recommandée par le comité d'éthique.

Les animaux sont élevés dans des locaux adaptés et avec un maximum de 7 animaux par cages, conformément aux recommandations des responsables du bien-être des animaux et en accord avec les dimensions des cages. Les cages contiennent des copeaux et sont enrichies avec du coton permettant aux souris de recréer des « espaces /niches » comme dans les conditions de leur habitat ancestral. Les animaliers nettoient les cages de manière hebdomadaire et s'assurent de l'approvisionnement en eau et nourriture tout au long de la vie des souris.

Le bénéfice attendu du projet est de déterminer le rôle de la sumoylation globale et de la sumoylation spécifique des cellules immunitaires T dans la défense anti-tumorale afin de pouvoir améliorer l'efficacité de l'immunothérapie des cancers.

**9638** En Afrique sub-saharienne, l'adulte femelle *Anopheles gambiae*, moustique hématophage et anthropophile, est le principal hôte et vecteur de *Plasmodium falciparum*, parasite responsable d'accès simples et compliqués de paludisme chez l'Homme. Chaque année, plus de 500 millions de cas cliniques sont enregistrés conduisant au décès d'environ 1 million d'individus. La situation est d'autant plus préoccupante que depuis plusieurs années, les parasites et les moustiques développent de plus en plus de résistances aux médicaments et aux insecticides respectivement. Aucun vaccin n'est aujourd'hui disponible.

Pour relever de tels défis, il est essentiel d'identifier et de caractériser les interactions *Plasmodium* – *Anopheles* afin d'identifier les bases génétiques du moustique, impliquées dans la transmission du parasite et de promouvoir de nouvelles stratégies pour bloquer la transmission du pathogène *Plasmodium*.

Ce projet concerne l'utilisation des souris porteuses des parasites plasmodiaux pour transmettre ces parasites à la femelle anophèle lors d'une pique. Notre objectif est d'identifier les gènes du moustique importants dans ces interactions entre le système immunitaire de l'insecte et les parasites présents dans le bol alimentaire.

Les souris sont l'hôte de laboratoire pour des espèces plasmodiales adaptées aux rongeurs et constituent donc un système de choix pour l'étude des interactions Plasmodium-Anopheles. Pour un nombre important de questions scientifiques, cette association expérimentale hôte-parasite peut palier aux difficultés et aux problèmes de sécurité associés à l'utilisation du parasite humain *P. falciparum*.

Nous disposons des lignées distinctes d'*A. gambiae* qui ont été adaptées à l'élevage au sein d'un insectarium contrôlé. Ces lignées ont un patrimoine génétique différent et nous allons leur présenter comme source de sang des souris anesthésiées, hébergeant des gamétocytes de Plasmodium adapté aux rongeurs de laboratoire. Le phénotype des anophèles ainsi nourris est ensuite déterminé et les moustiques sont génétiquement caractérisés.

Concernant l'effectif de souris, un total de 800 souris femelles, âgées de 7 semaines, sur 5 ans, hébergeant des gamétocytes de Plasmodium adapté aux rongeurs de laboratoire, devrait suffire pour la caractérisation phénotypique des lignées anophèles. Pour chaque expérience nous allons inoculer quatre souris avec le parasite plasmodial. Ceci permet de déterminer la susceptibilité de quatre lignées de moustique. La souche de Plasmodium utilisée est non létale : aucune mortalité n'a été observée durant le temps d'incubation des parasites dans la souris.

Les souris seront hébergées dans une animalerie dédiée, calme et d'accès restreint à un petit nombre de manipulateurs expérimentés. Nous allons utiliser une procédure expérimentale avec un niveau de sévérité légère dans nos expériences. La plupart des interventions sont réalisées sur animal anesthésié, ce qui évite tout stress, inconfort ou douleur chez l'animal.

A la fin des procédures et après l'infection des moustiques les souris sont euthanasiées conformément au protocole défini pour cette espèce car, après leur guérison de l'infection, elles deviennent réfractaires aux parasites et ne pourront donc plus être infectées.

**9639** Le glyphosate est l'un des herbicides foliaires non-sélectifs les plus largement utilisés dans le monde. Son utilisation extensive fait que sa substance active (SA) et son métabolite principal, l'acide aminométhyl phosphonique (AMPA), sont très largement retrouvés dans les masses d'eaux superficielles et souterraines. Si les propriétés physico-chimiques de la SA sont plutôt en faveur d'une certaine innocuité environnementale, des études récentes ont néanmoins révélé des effets cancérigène, génotoxique, neurotoxique et tératogène chez différents organismes. De même, il semblerait que les adjuvants utilisés dans certaines formulations commerciales génèrent une toxicité supérieure à la SA seule. Les données disponibles à l'heure actuelle permettant d'évaluer l'innocuité sanitaire et environnementale du glyphosate divise les experts dans un contexte où le renouvellement de son autorisation se pose au sein de l'Union Européenne.

Le projet GLYPHOTAC a pour objectif d'améliorer les connaissances sur l'impact du glyphosate et de ses adjuvants sur l'environnement, la santé et le bien-être des animaux. L'écotoxicité du glyphosate seul ou co-formulé sera évaluée chez la truite arc-en-ciel (TAC) en évaluant leur état de santé général au travers du suivi de paramètres immunitaires, de leurs défenses antioxydantes et de leur capacité de reproduction.

Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée afin de simuler l'exposition chimique chronique au glyphosate observée dans l'environnement, via la SA seule ou via un produit phytosanitaire commercialisé. Au total, 120 truites adultes seront exposées sur une période prolongée de 24 mois à une concentration semblable aux concentrations retrouvées dans les cours d'eau bretons. Cette procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux : volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche. En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écophysiologie et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ces travaux. Enfin, des prélèvements de sang ponctuels nous permettront d'obtenir une évaluation complète des effets possibles de la contamination chimique sur la santé de la truite arc-en-ciel à différents stades de développement. A la fin de l'expérimentation, les poissons seront euthanasiés et

les organes cibles (branchies, foie, rate) seront prélevés pour suivre des biomarqueurs d'exposition et d'effet. Ainsi, la bioconcentration en molécules chimiques, les activités enzymatiques des défenses antioxydantes ou encore l'expression de gènes d'intérêt liés à la réponse immunitaire pourront être étudiés.

**9640** Notre laboratoire est engagé dans des programmes de recherches ayant pour but principal de découvrir et de développer de nouveaux médicaments pour lutter essentiellement contre les maladies de la sphère gastro-intestinale d'origine métabolique ou inflammatoire.

Le processus de développement prend donc naissance au laboratoire de chimie par l'invention puis la synthèse de nouvelles molécules innovantes.

Les propriétés physico-chimiques des composés sont étudiées, leurs potentielles caractéristiques de futur médicament sont évaluées par des mesures d'activité dans des modèles *in vitro* avant qu'il soit décidé de les évaluer chez l'animal.

Avant même de pouvoir étudier l'efficacité intrinsèque des molécules dans un modèle animal affecté d'une pathologie précise, il est nécessaire de savoir comment la molécule se comporte une fois administrée à un organisme vivant.

C'est-à-dire quel sera son devenir dans un organisme et quel sera son impact sur l'organisme vivant dans lequel elle est administrée.

Pour être efficaces, les molécules doivent pouvoir atteindre leur organe-cible, une fois administrées à un être vivant, que ce soit par voie orale ou par injection, les molécules subissent des modifications chimiques, elles sont véhiculées, stockées ou éliminées. Toutes ces différentes étapes caractérisent le futur médicament et constituent les critères qui doivent être étudiés *in vivo*.

Le projet décrit ici a donc pour objectif de détailler une procédure de pharmacocinétique expérimentale qui permet d'étudier ces caractéristiques préalablement au développement de molécules candidates à devenir de futurs médicaments indiqués dans diverses pathologies.

Cette procédure préalable, nécessite peu d'animaux au regard de l'ambition des programmes menés, ils permettent d'ajouter un filtre supplémentaire dans notre arbre de sélection des nouvelles molécules qui seront destinées aux études d'efficacité chez l'animal.

Cela permet par voie de conséquence de réduire considérablement le nombre global d'animaux utilisés pour ces développements, ceci en respect de la règle des 3R's qui dicte l'expérimentation animale. Les études pharmacocinétiques produisent un inconfort modéré aux animaux qui les subissent, il est cependant mis en œuvre toutes les mesures qui permettent de diminuer le stress et la douleur notamment l'anesthésie lors des prélèvements répétés chez les animaux et l'analgésie qui l'accompagne que nous jugeons nécessaire.

Lors des études d'évaluation de l'apparition des effets délétères, les animaux sont en observation continue, la mise en œuvre de l'application des points limites définis préalablement aux réalisations des expériences est immédiate s'ils sont atteints.

L'ensemble des procédures décrites dans ce projet appliquées à des rats nécessitera l'emploi de 2000 rats pour la durée de 5 années que couvre ce projet.

**9641** L'ocytocine (OT) est un neuropeptide synthétisé dans l'hypothalamus qui joue un rôle dans la parturition et l'allaitement mais qui agit aussi comme neuromodulateur dans le système nerveux central pour moduler de nombreux comportements sociaux.

Actuellement, des traitements à l'OT sont essayés chez l'humain pour tenter de remédier à certains déficits de comportement social, mais les mécanismes permettant des améliorations de comportement social restent totalement inexplorés. Nous nous proposons d'étudier les mécanismes d'action de l'OT chez la souris en étudiant l'impact de l'OT sur le traitement des informations auditives, plus particulièrement sur le traitement des signaux de communication acoustique.

Deux types de situations seront utilisés pour préciser le rôle de l'OT sur le traitement des signaux de communication acoustique. D'une part, nous comparerons les réponses neuronales chez des animaux vierges et chez des animaux ayant mis bas dans les jours qui précèdent et qui ont un taux d'OT élevé. D'autre part, nous comparerons les réponses neuronales chez des animaux ayant un taux plasmatique normal d'OT et chez des animaux ayant un taux plasmatique très bas en OT, à savoir une souris mutante pour un canal calcique impliqué dans la libération de l'OT.

Dans ces 2 situations, l'activité de très nombreux neurones sera enregistrée dans le cortex auditif afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Chez l'animal sous anesthésie générale profonde, les réponses électrophysiologiques de 50-70 neurones seront enregistrées lors d'une procédure sans réveil au cours de laquelle l'état physiologique sera soigneusement contrôlé. Chez l'animal vigile, nous enregistrerons par imagerie calcique non-invasive l'activité de larges populations de neurones (plusieurs centaines) et le cortex auditif d'un même animal pourra être imagé de multiple fois, ce qui limitera considérablement le nombre d'animaux (nous prévoyons l'utilisation d'un total de 80 animaux sur les 4 ans de ce projet sur animal vigile).

Tant que possible, les procédures ont été raffinées pour permettre une meilleure prise en charge du bien-être animal : les femelles gestantes seront hébergées à plusieurs par cage afin de permettre la survie des petits lorsque les mères seront utilisées en expérimentation. Les cages d'hébergement seront aussi enrichies pour permettre la construction de nid. Les animaux testés sous anesthésie générale profonde ne se réveilleront pas de leur sédation (anesthésie générale et locale au point d'ouverture des tissus). Les animaux vigiles testés seront surveillés tout au long de la procédure en veillant sur leur poids et leur état comportemental.

A ce jour, il est impossible d'étudier des mécanismes impliqués dans la perception de stimuli auditifs in vitro ou sur des cultures cellulaires, il y a nécessité de tester des réponses sensorielles in vivo. Les études en imagerie chez l'homme n'ont ni la résolution spatiale ni la résolution temporelle suffisante pour adresser des mécanismes cellulaires mis en jeu à la présentation de signaux sensoriels.

Ce projet permettra donc de comprendre les mécanismes cellulaires qui permettent à l'OT de moduler la perception de stimuli naturels signifiants (cris de nouveau-nés). Cela amènera des informations cruciales sur les phénomènes de plasticité qui se produisent dans le cortex auditif et permettre la mise en place précoce des relations mère-nouveau-nés.

**9642** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. De plus, l'incidence de la mortalité cardiovasculaire augmente avec les facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'hypertension artérielle et le diabète. Plusieurs études précliniques et cliniques ont montré que l'hypertension artérielle était précocement associée à une dysfonction endothéliale participant au développement du remodelage vasculaire et cardiaque, menant à terme à des épisodes aigus (infarctus, AVC, etc.) et à une insuffisance cardiaque. Bien que les thérapies anti-hypertensives actuelles, comme les inhibiteurs calciques et les médicaments ciblant le système angiotensine, permettent de réduire la pression artérielle de façon efficace, elles ne semblent restaurer la protection vasculaire que de très partiellement.

Une récente étude clinique a montré qu'un nouveau traitement antidiabétique pouvait diminuer de 38 % le risque d'un premier évènement cardiovasculaire chez des patients atteints d'un diabète de type 2 avec un haut risque cardiovasculaire. L'étude clinique a aussi montré une forte réduction (35%) du nombre d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque, indiquant que cette molécule aurait un fort effet protecteur sur le système cardiovasculaire. Toutefois, les effets protecteurs de ce traitement vis-à-vis du système cardiovasculaire ne peuvent pas s'expliquer par le seul effet antidiabétique relativement faible, suggérant un effet protecteur direct de la molécule sur les vaisseaux sanguins et le cœur.

Le but du présent projet est donc d'évaluer l'effet protecteur d'un nouvel antidiabétique oral sur l'induction des répercussions cardiaques et vasculaires prématurées dans un modèle d'hypertension artérielle non lié au diabète.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 69 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les altérations vasculaires et cardiaques sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et d'approches statistiques adaptées (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux), par le recours à des méthodes de mesures non-invasives (échocardiographie doppler sous anesthésie gazeuse, prise de pression par brassard à la queue), et par l'utilisation d'anesthésiques, d'antalgiques et de soins péri- et post-opératoires adaptés.



**9643** La prise en charge actuelle du cancer de l'ovaire repose sur un traitement chirurgical parfois associé à une chimiothérapie mais l'efficacité thérapeutique globale reste peu satisfaisante puisque la survie à 5 ans ne dépasse pas 35%. Il a été décrit que l'exhaustivité de la résection tumorale conditionne principalement la survie des patientes. Ce projet se propose d'améliorer l'efficacité de la prise en charge thérapeutique du cancer de l'ovaire au moyen d'une approche thérapeutique innovante complétant la résection chirurgicale des tumeurs en visant l'éradication des reliquats tumoraux par thérapie photodynamique per-opératoire au moyen d'un nouvel agent photosensibilisant. Ce dernier permet la production, via irradiation lumineuse, d'oxygène singulet hautement toxique pour les cellules. Il peut également stocker et transporter l'oxygène singulet puis le libérer secondairement sous l'effet de la température, ce qui permettrait ainsi un effet thérapeutique prolongé.

Pour cibler la tumeur le photosensibilisant sera vectorisé de deux façons possibles : 1) au moyen de nanoparticules lipidiques, ou bien 2) au moyen de trois vecteurs peptidiques spécifiques de biomarqueurs tumoraux. L'efficacité du nouveau photosensibilisant sera comparé à celle d'un photosensibilisant de référence (Visudyne®), actuellement utilisé en clinique mais ne présentant pas de ciblage spécifique vers la tumeur. Une approche parallèle consistera à encapsuler le photosensibilisant de référence (Visudyne®) dans les nanoparticules lipidiques pour le vectoriser vers la tumeur.

Le projet vise à :

1) Evaluer par imagerie de fluorescence non invasive la biodistribution in vivo et le ciblage tumoral chez des souris porteuses de tumeur d'origine ovarienne du nouveau photosensibilisant, des 6 versions de ce photosensibilisant vectorisées pour cibler la tumeur et du photosensibilisant de référence (Visudyne®) encapsulé dans les nanoparticules lipidiques.

2) Evaluer l'efficacité thérapeutique de la thérapie photodynamique du nouveau photosensibilisant et des 6 versions vectorisées pour cibler la tumeur en comparaison de celle du photosensibilisant de référence (Visudyne®) encapsulé dans les nanoparticules lipidiques ou non chez des souris porteuses de tumeurs d'origine ovarienne.

Dans ce projet nous utiliserons 290 souris nude.

La règle des « 3R » guidera toutes les procédures expérimentales :

Remplacer :

L'ensemble des candidats photosensibilisants qui seront testés in vivo ont été préalablement testés et validés in vitro dans plusieurs modèles cellulaires de lignées tumorales ovariennes humaines. Cependant, il est indispensable après ces étapes in vitro d'étudier le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme vivant.

Les modèles expérimentaux animaux, et en particulier les modèles murins, sont les plus adaptés pour la reproduction de la carcinose d'origine ovarienne, à la fois pour l'induction de la pathologie, son évolution et son traitement. Ces modèles permettent d'avancer dans la mise au point de nouvelles thérapies anti-tumorales et de procéder à leur évaluation préclinique avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail.

Réduire :

Les tests in vitro nous ont permis de sélectionner les composés candidats les plus prometteurs et de réduire le plus possible les évaluations in vivo.

Le nombre d'animaux par groupe sera optimisé pour réduire le plus possible l'usage des animaux en se basant sur une approche statistique qui permettra d'obtenir des résultats exploitables.

Raffiner :

Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole utilisé est optimisé en termes d'anesthésie et d'analgésie afin d'obtenir le maximum d'informations tout en gérant la douleur possible des animaux.

**9644** Des données de la littérature de plus en plus importantes semblent indiquer que l'exposition à des molécules carcinogènes environnementales représente un facteur de risque du cancer du sein. Il est donc primordial de décrypter le rôle que peuvent jouer chez l'Homme certains facteurs environnementaux dans le développement des cancers mammaires.

De manière originale, ce projet propose d'utiliser un modèle in vitro de progression tumorale du cancer du sein, comprenant 3 lignées cellulaires qui miment la progression de l'état bénin à l'état pré-malin, et de l'état pré-malin à l'état malin. Ce modèle de progression tumorale sera utilisé afin

d'étudier l'impact sur le développement du cancer du sein d'une exposition chronique à de faibles doses de deux molécules environnementales carcinogènes : le Bisphenol A (BPA) (présent dans la fabrication des plastiques, boîtes de conserve.) et le Benzo[a]pyrene (B(a)P), (combustion du bois, gaz d'échappement de voiture.).

L'objectif est de déterminer 1- si l'exposition à ces molécules favorisent la progression de l'état benin (normal) à prémalin (ou malin) et de l'état prémalin à malin et 2- si cette progression est accompagnée du développement de métastases. Ce projet a aussi pour objectif de déterminer si la combinaison de ces deux molécules, ayant deux mécanismes de toxicité distincts, potentialise les effets des deux molécules testées individuellement.

Ce projet propose une étude complète, à la fois in vitro et in vivo, afin d'explorer à divers niveaux (cellulaire, moléculaire) l'impact de l'exposition [BPA et/ou B(a)P]. Les résultats escomptés devraient conduire à différentes retombées scientifiques, sociales et environnementales : (i) l'approfondissement de nos connaissances sur l'exposition au BPA et au B(a)P et les conséquences de cette exposition sur le développement du cancer du sein. (ii) l'identification de nouveaux marqueurs de l'exposition au BPA et/ou B(a)P ; (iii) l'identification de nouvelles cibles moléculaires pour de futurs agents thérapeutiques dans le traitement des cancers mammaires dûs à l'exposition chronique au BPA et/ou au B(a)P.

Finalement, en validant le modèle de progression tumorale utilisé dans ce projet, un nouvel outil biologique sera disponible pour la communauté scientifique pour cribler ou détecter des molécules toxiques. En conclusion, ce projet espère réaliser des progrès et des avancées méthodologiques pour l'évaluation de l'impact de l'exposition à des facteurs environnementaux sur le développement du cancer du sein.

Les lignées cellulaires seront exposées in vitro pendant 60 jours aux BPA et/ou au B(a)P. Elles seront ensuite implantées chez la souris, sans traitement particulier. Les cellules seront bioluminescentes, permettant ainsi de suivre à la fois la croissance tumorale et un éventuel processus métastatique. Dans ce projet, 3 lignées cellulaires seront testées (bénigne, prémaline et maline) nécessitant l'utilisation de 124 souris immunodéprimées :

- une expérience préliminaire sera effectuée avec la lignée la plus agressive pour tester la meilleure prise tumorale entre une implantation orthotopique (i.e. mammaire ; 8 souris) et une implantation sous-cutanée (i.e. sur le flanc de l'animal; 8 souris). Cette étude permettra également de déterminer des valeurs seuil de signal bioluminescent en cas d'envahissement métastatique (principalement ganglionnaire et pulmonaire). Ces valeurs seuil de signal bioluminescent correspondent directement à des niveaux d'envahissement métastatique et serviront de point limites pour la suite de l'étude.
- la lignée bénigne sera évaluée en l'absence de traitement (12 souris), en présence de BPA (12 souris), en présence de B(a)P (12 souris) et en présence des deux composés (12 souris).
- la lignée prémaline sera évaluée en l'absence de traitement (12 souris), en présence de BPA (12 souris), en présence de B(a)P (12 souris) et en présence des deux composés (12 souris).
- la lignée maline sera implantée en contrôle positif (12 souris).

Les animaux seront gardés en vie et suivis jusqu'à l'obtention d'une différence entre les groupes, ou euthanasiés si un des points limites est atteints ;

Nous utiliserons 124 animaux, conformément à la règle des 3R :

Remplacer : Les tests in vitro ont permis de réduire le nombre de composés à tester ainsi que le nombre de lignées de cellules. Les paramètres de toxicité sont obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. Cette étude est nécessaire pour mieux comprendre l'impact des molécules environnementales sur le développement du cancer mammaire chez l'homme.

Réduire : L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Les cellules tumorales seront implantées en sous-cutané ou dans la mamelle (sur 12 animaux). Toutes les souris seront utilisées, sachant qu'une tumeur qui ne se développe pas constitue quand même une information scientifique qui sera prise en compte. 12 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable, évitant ainsi de refaire l'expérience.

Raffiner : Nous utiliserons des souris immunodéprimées, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement

contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. La croissance des tumeurs mammaires n'entraîne pas de gêne et sera suivie régulièrement au pied à coulisse et par imagerie de bioluminescence. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

**9645** La santé intestinale est un enjeu majeur en production animale et le sevrage est une période particulièrement sensible aux troubles digestifs. A cette période, la maîtrise de la santé est dépendante de la mise en place du dialogue entre l'hôte et son microbiote, partenaire symbiotique de l'écosystème digestif en contact permanent avec l'aliment. La santé intestinale peut être sensiblement affectée par l'exposition à des mycotoxines. Ce sont des substances toxiques produites par certaines moisissures qui sont douées d'une grande stabilité durant le stockage des denrées mais également au cours des traitements technologiques de préparation des aliments.

La grande fréquence des contaminations de céréales par les fusariotoxines (ou mycotoxines produites par les moisissures du genre *Fusarium*) fait du porc une cible particulièrement exposée à ce type de contaminant alimentaire en raison de son régime alimentaire. Les signes cliniques associés à une ingestion massive de toxines de *Fusarium* sont principalement, une baisse de l'ingestion voire de l'anorexie, la diarrhée et le vomissement, le retard de croissance, un rougissement et une tuméfaction vulvaire chez la truie, et une baisse de sa prolificité. Des signes plus insidieux, comme une sensibilité accrue aux infections, existent également. Aux doses n'entraînant pas de manifestations extérieures visibles, ces toxines affectent la physiologie intestinale, notamment en altérant la fonction de barrière, en perturbant l'absorption des nutriments, en induisant de l'inflammation, et en augmentant la susceptibilité aux infections intestinales.

Différentes stratégies sont préconisées pour limiter les effets des mycotoxines ou d'autres contaminants alimentaires sur la santé intestinale. Il s'agit par exemple de l'apport direct de microorganismes utiles de la flore digestive appelés probiotiques, ou de l'apport de substrats alimentaires appelés prébiotiques, qui favorisent la croissance ou l'activité de ces microorganismes. Cependant, l'absence d'outils techniques, capables de rendre compte de la santé digestive des animaux, ou de la prédire, est un frein majeur à l'évaluation de l'efficacité de ces stratégies alimentaires.

L'objectif majeur de cette étude est d'identifier des paramètres renseignant sur la santé digestive chez le porc, en particulier ceux qui sont affectés par une exposition alimentaire aux différentes fusariotoxines, afin de proposer des protocoles fiables d'évaluation de l'efficacité de probiotiques et prébiotiques proposés en nutrition animale en prévention des effets de ces mycotoxines. A notre connaissance, très peu de ces paramètres encore appelés marqueurs de santé intestinale ont été validés chez le porc pour une utilisation en conditions de terrain. Les marqueurs pressentis sont les cytokines inflammatoires, les protéines de la phase aigüe, et l'I-FABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein).

Aux doses de mycotoxines potentiellement rencontrées dans l'alimentation animale, l'identification de ces marqueurs au niveau sanguin et dans les fèces, ou au niveau de l'intestin et d'autres organes nécessite le recours à une expérimentation in vivo. En effet, aucune étude in vitro ou ex-vivo ne permettrait d'identifier de façon fiable ces marqueurs, et de plus l'expérimentation in vivo permet d'envisager un suivi clinique des animaux pour une corrélation avec certains marqueurs au cours du temps.

Au total, 160 porcelets au sevrage (âgés de 28 jours) seront utilisés après une période d'acclimatation d'une semaine dans les quatre phases de cette étude correspondant aux quatre groupes de toxines de *Fusarium* (trichothécènes, fumonisines, zéaralénone et toxines émergentes) retrouvés dans les aliments. En effet, en raison de la variabilité naturellement observée pour l'expression des marqueurs pressentis, un effectif de 10 sujets par groupe expérimental est un minimum pour mettre en évidence des différences statistiques si elles existent.

Les animaux des lots expérimentaux exposés aux toxines de *Fusarium* recevront des aliments contaminés à des niveaux correspondants à ceux qui sont fréquemment retrouvés dans les lots commercialisés pour l'alimentation animale (maximum 5 mg/kg aliment). Les doses choisies sont très

éloignées de celles décrites pour entraîner des effets toxiques aigus (vomissements, altération des systèmes digestifs et sanguins) qui apparaissent à partir de 12 mg DON/kg aliment. Les doses que nous utilisons sont décrites pour n'entraîner aucun signe clinique particulier, en dehors d'une réduction très modérée de la prise alimentaire et quelques rares cas de vomissement. Un suivi quotidien sera toutefois instauré pour permettre une détection précoce de toute situation pathologique. En outre, en plus des lampes chauffantes, des tubes à mâcher sont prévus pour l'enrichissement des boxes des animaux, ainsi que des aires de repos.

**9646** Ce TP concerne des étudiants de première année après le BAC dans le cadre des enseignements de physiologie animale. Ces étudiants sont destinés à la profession de technicien et doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique ou dans des structures privées, par exemple dans le domaine de la pharmacologie. Ils peuvent donc être amenés, au cours de leur carrière, à travailler sur des animaux vivants. Les professionnels, susceptibles de les recruter, souhaitent que ces étudiants soient bien formés aux techniques utilisées en expérimentation animale et soient bien sensibilisés à la notion d'éthique.

Dans ce cadre, ces TP ont plusieurs objectifs, qui s'intègrent dans le programme pédagogique national du diplôme préparé, relatifs à la biologie, à la physiologie des grandes fonctions et à l'expérimentation animale :

1. Mettre en pratique l'enseignement théorique en physiologie de la reproduction.
2. Initier les étudiants à la mise en application d'un protocole expérimental visant à évaluer l'effet d'hormones *in vivo* et à la réalisation d'actes chirurgicaux.
3. Former et responsabiliser les étudiants à la mise en œuvre d'une expérimentation animale chez le rat et à l'éthique (manipulation et surveillance des animaux anesthésiés, réalisation de procédures chirurgicales et de procédures faiblement invasives.).

Ces TP seront réalisés sur des rats mâles Wistar pubères (âgés au moins de 7 semaines). Les rats constituent un modèle animal bien connu d'un point de vue physiologique - notamment sur la fonction de reproduction - et qui de plus est très utilisé dans les établissements de recherche et notamment dans les domaines de la pharmacologie. Ainsi, former les étudiants sur ce modèle présente un avantage indéniable pour eux, aussi bien pour leur stage de fin de formation que pour leur insertion dans le milieu professionnel.

Au cours de ces TP concernant l'étude de la régulation hormonale de l'axe reproducteur mâle, chez le rat, les étudiants réaliseront : i) l'ablation des 2 testicules sur un animal anesthésié et analgésié ; ii) l'injection d'une hormone, soit la testostérone (propionate de testostérone) par voie sous-cutanée, soit l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), ou équine (eCG), par voie intramusculaire. Les effets des hormones seront étudiés sur le poids des glandes annexes sexuelles (vésicules séminales et glandes coagulantes) et comparés entre les différents lots et notamment en comparaison à celui des glandes des rats contrôles sans ablation des testicules avec ou sans supplémentation en hCG (ou eCG).

Au total quatre lots de rats seront constitués :

- contrôle (sans chirurgie) + hCG (ou eCG)
- ablation sans traitement hormonal
- ablation + hCG (ou eCG)
- ablation + testostérone

Des données antérieures seront utilisées pour un 5ème groupe, contrôle sans traitement hormonal, afin de faire une analyse complète des résultats obtenus en diminuant le nombre d'animaux utilisés. Réduction : Chaque année 7 groupes de 14 étudiants maximum réaliseront ce TP. Dans chaque groupe, les étudiants auront 1 rat par binôme. Chaque étudiant du binôme réalisera l'ablation d'un des testicules et le binôme prendra en charge le traitement hormonal et le suivi de son animal. Afin de réduire le nombre d'animaux, aucun animal ne sera utilisé pour le lot contrôle sans chirurgie et sans traitement hormonal, les résultats des TP des années antérieures seront utilisés par les étudiants. De même pour le lot témoin + hCG (ou eCG), seul un animal sera inclus par groupe d'étudiants et les données obtenues seront compilées avec celles des années antérieures. Enfin, un rat par groupe d'étudiants servira à la réalisation des démonstrations des différentes procédures par un enseignant et entrera dans le lot ablation + sans traitement hormonal et un rat surnuméraire sera

prévu. Ainsi 10 rats par groupe d'étudiants seront utilisés, soit un total de  $10 \times 7 = 70$  rats par an et soit 350 rats pour 5 ans. Ce nombre d'animaux sera revu à la baisse en fonction du nombre d'étudiants. Afin de comparer les résultats obtenus entre les lots expérimentaux, les étudiants travailleront sur les résultats obtenus pour l'ensemble des rats des 7 groupes d'étudiants et par an.

Raffinement : les animaux seront hébergés par 2 ou 3 dans des cages appropriées à leur espèce et à leur poids et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix). Avant les TP, les étudiants seront sensibilisés aux procédures à réaliser (TD, images, vidéo) et au comportement à avoir (être calme, éviter les gestes brusques...). Tout animal stressé ou malade sera exclu et remplacé par un animal surnuméraire (1 animal maximum / groupe de 14 étudiants). L'ablation des testicules sera réalisée sous anesthésie et analgésie multimodale. La profondeur de l'anesthésie sera évaluée avant de commencer la procédure mais également tout au long du TP, par les étudiants et le personnel enseignant. Tout signe de réflexe de l'animal induira l'administration immédiate d'une demi-dose supplémentaire d'anesthésique. Pendant toute la durée du TP, les animaux seront placés sous une lampe afin d'éviter toute hypothermie. Les animaux recevront également un mélange d'antibiotiques par voie cutanée sur la suture, puis un traitement anti-inflammatoire après la chirurgie. L'administration des hormones sera réalisée sur les animaux encore anesthésiés et sera donc sans douleur pour l'animal.

Remplacement : dans le cadre de la formation de nos étudiants, le programme pédagogique prévoit, en physiologie et pharmacologie, l'évaluation in vivo des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux. L'évaluation des étudiants sur ces pratiques sont inscrits dans le programme, que nous sommes tenus de respecter. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant la formation adéquate des étudiants.

**9647** Cette formation a comme objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel réalisant des actes chirurgicaux sur l'animal dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant. La formation est organisée en Mars, Mai et Novembre de chaque année. Cette formation suit un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) avec des cours (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de cette demande, seules les séquences pédagogiques utilisant des animaux seront décrites, à savoir :

Séance de néphrectomie utilisant des lapins  
Séance de TP d'implantation de cathéters utilisant des lapins

En fin de formation, les animaux sont euthanasiés. A chaque fois, nous recherchons, auprès de nos collègues enseignant-chercheurs, si une opportunité se présente pour utiliser leurs cadavres à titre pédagogique (séance de TP d'anatomie ou TP de sutures par exemple).

Le nombre de stagiaires par session de formation est variable d'une session à une autre et se trouve généralement de 14 maximum, ce qui amène à utiliser 14 lapins pour un groupe de 14 stagiaires, à chaque formation, soit 210 Lapins sur 5 ans.

En matière de remplacement, l'utilisation de méthodes alternatives précède la mise en œuvre des techniques chirurgicales sur animaux vivants, par exemple pour la réalisation des sutures. En matière de réduction, le nombre d'animaux utilisés est restreint et l'organisation en groupe de travail est favorisée pour mutualiser (2 stagiaires pour un animal opéré sur certaines séquences par exemple). En matière de raffinement, les protocoles d'anesthésie-analgésie sont adaptés de manière à éviter toute douleur ou souffrance aux animaux. L'objectif de cette formation est d'améliorer la pratique quotidienne des stagiaires afin qu'ils puissent appliquer les principes du raffinement dans leurs expérimentations (meilleur choix des protocoles anesthésiques, meilleur monitoring et meilleure prise en charge post-opératoire par exemple), et ainsi obtenir une meilleure efficacité notamment une meilleure reproductibilité dans les résultats ce qui aboutit à une réduction du nombre d'animaux utilisés pour atteindre les objectifs scientifiques.

**9648** Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigées contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois lié à des

facteurs génétiques. Ainsi, une mutation du gène STING, conduisant à une hyperactivation de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints d'un syndrome inflammatoire systémique (appelé SAVI) associée à des symptômes proches d'un lupus. L'hyperactivation de Sting chez ces patients conduit à la production excessive d'interféron de type I (IFN-I), molécule importante dans le développement du LED. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une autoimmunité, nous avons produit un nouveau modèle transgénique murin (modèle Sting V154M), portant la mutation de sting équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle va nous offrir l'opportunité d'effectuer des investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'autoimmunité en cas d'hyperactivation de Sting, et d'explorer les mécanismes de production d'autoanticorps.

Ce projet comprend 4 objectifs :

I. Confirmer l'hyperactivation de Sting dans les animaux Sting V154M et étudier le phénotype des souris à l'état basal (phénotype des cellules immunitaires et développement d'une autoimmunité)

II. Etudier la réponse anticorps

III. Etudier les mécanismes de la production d'autoanticorps en cas de d'hyperactivation de Sting, en croisant le modèle Sting V154M avec un modèle transgénique murin (56R) permettant de suivre facilement les cellules produisant les autoanticorps

IV. Etudier le rôle de l'IFN-I dans le phénotype observé chez les souris Sting V154M, en croisant les souris Sting V154M avec des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN-I.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée. Pour répondre à ces 4 objectifs, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques, nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris pour chaque question posée, soit 260 souris pour le projet global (voir procédures expérimentales).

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). De plus, avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites.

La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les réponses immunes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons avoir recours à des modèles in vitro. En ce qui concerne les modèles in vivo, la souris est le modèle approprié afin d'étudier les fonctions du système immunitaire, car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'immunité et de l'autoimmunité.

Considérant le rôle important de l'IFN I dans la pathogénie du LED et d'autres interféronopathies (pathologies dues à une production excessive d'IFN-I), ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des conséquences de la production excessive d'IFN I dans l'autoimmunité, et à l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients.

**9649** Le cil est une extension microscopique de la cellule. Il peut être mobile (ou motile) tel le flagelle du spermatozoïde ou immobile, on l'appelle alors cil primaire. Dans le rein, le cil primaire est situé à la surface des cellules rénales qui forment des tubes dans lesquels l'urine est formée. Grâce à cette position stratégique, le cil primaire capte des signaux mécaniques et chimiques induits par le flux urinaire et les transmet à la cellule.

Les maladies génétiques qui affectent le cil primaire sont appelées ciliopathies. Parmi celles-ci, on distingue les ciliopathies rénales qui sont des maladies héréditaires sévères touchant aussi bien les adultes que les enfants. La polykystose rénale autosomique dominante est la plus fréquente des ciliopathies rénales. Elle affecte les adultes et est responsable de 10% des insuffisances rénales terminales. La néphronophthise est une ciliopathie affectant les enfants et représente la première cause d'insuffisance rénale génétique dans cette population. L'efficacité des traitements visant à freiner l'évolution de la maladie avant le stade terminal est actuellement très limitée.

Des découvertes scientifiques récentes suggèrent que les infections rénales et l'obstruction urétérale (par des lithiases par exemple) favorisent le déclin de la fonction rénale chez les patients présentant ce type d'affections. On pense que le cil primaire serait capable de « capter » un signal de danger, comme par exemple un obstacle à l'écoulement de l'urine et d'entraîner, en réponse, une inflammation rénale.

Le but de ce projet est d'évaluer le lien entre cil primaire, obstruction urinaire, infection bactérienne et progression des maladies rénales chroniques.

Dans un contexte de recherche physiopathologique, il est indispensable de recourir à l'utilisation raisonnée de modèles murins car aucun modèle cellulaire ne permet d'aborder la complexité des phénomènes mis en jeu lors du développement de la maladie rénale chronique. Afin d'explorer ces phénomènes, nous combinerons un modèle chirurgical d'obstruction urinaire à une infection urinaire bactérienne. Nous appliquerons ces modèles à des souris qui ont été génétiquement modifiées pour permettre « d'éteindre » un ou plusieurs gènes spécifiquement dans les cellules rénales. Nous utiliserons quatre lignées de souris : deux d'entre elles, en « éteignant » des gènes importants pour la formation du cil primaire, permettent d'obtenir des souris sans cil primaire au niveau des cellules rénales. Une autre lignée de souris permet de mimer la maladie humaine de polykystose rénale autosomique dominante en « éteignant », au niveau rénal, le gène *Pkd1* : l'un des deux gènes mutés chez les patients souffrant de cette affection. Enfin, les cellules rénales des souris de la dernière lignée n'ont plus ni cil primaire ni gène *Pkd1*.

Le nombre d'animaux est évalué à 1584 souris sur 3 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace. L'ensemble de ce projet fera appel à 4 procédures distinctes :

- La procédure 1 consiste en l'élevage des 4 lignées de souris génétiquement modifiées
- La procédure 2 appliquera à ces souris un modèle chirurgical d'obstruction urinaire
- La procédure 3 appliquera un modèle d'infection urinaire bactérienne
- La procédure 4 combinera à la fois le modèle chirurgical d'obstruction urinaire et le modèle d'infection urinaire bactérienne

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, la chirurgie et l'infection urinaire bactérienne seront réalisées sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Les souris seront surveillées quotidiennement, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

En permettant de mieux comprendre le lien existant entre cil primaire et progression des lésions rénales, ce projet est à même de déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques dédiées aux patients souffrants d'affection rénale liée à une dysfonction du cil primaire.

**9650** Les maladies du rein sont un problème de santé publique de plus en plus grave dans les sociétés occidentales. En France, plus de 45.000 personnes souffrent d'une insuffisance rénale de stade terminal, jusqu'à 7000 nouveaux cas sont dénombrés chaque année. Au cours du développement de la maladie rénale, le rein perd sa capacité de filtration. Cela provoque une augmentation des protéines dans l'urine. La perte des protéines dans l'urine entraîne un certain nombre de symptômes tels que l'œdème, l'excès de graisses dans le sang et des problèmes de coagulation. Les protéines sont aussi responsables du transport des lipides et, par conséquent, un excès des protéines dans l'urine entraîne également un excès de graisses pour les cellules rénales.

L'excès de graisse est toxique pour tous les organes, et le rein ne fait pas exception. En effet, les graisses saturées deviennent toxiques si elles ne sont pas correctement stockées dans les gouttelettes lipidiques. Donc, la formation de ces gouttelettes protège les tissus contre les effets toxiques des graisses nocives.

Le syndrome néphrotique est une affection rénale avec des conséquences néfastes pour l'organisme entier. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier correctement les symptômes et les interactions entre les organes qui se produisent dans cette maladie, comme : les dommages aux glomérules affectant les cellules tubulaires.

Nous travaillerons avec des modèles de souris pour la maladie. Ces modèles seront générés par modifications génétiques ou par administration de médicaments. Nous analyserons la fonction rénale en réalisant des prélèvements urinaires.

Après 4 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélever les organes afin d'étudier l'histologie et les mécanismes moléculaires induits par les lésions rénales.

Le nombre de souris utilisées sera de 204 pour une durée de 5 ans. Nous utiliserons différentes lignées de souris modifiées génétiquement afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les lésions tubulaires. Nous cherchons ainsi à valider in vivo et in vitro des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études chez la Drosophile.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et le stress infligé aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire

Avec ces recherches, nous espérons élargir la compréhension des mécanismes qui protègent le rein et ainsi concevoir des stratégies thérapeutiques contre l'insuffisance rénale.

**9651** L'obésité est un facteur clé du syndrome métabolique, défini comme étant un ensemble de signes physiologiques qui accroissent le risque de diabète de type 2, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral. L'obésité engendre aussi un risque accru de forme sévère de pancréatite aiguë. Sachant que l'activité pharmacologique d'un candidat médicament (produit pharmaceutique chimique ou biologique) est caractérisée par l'effet induit dans un organisme, elle est donc déterminante dans le devenir de ce candidat. C'est pourquoi, il est nécessaire d'évaluer le mécanisme d'action et l'activité thérapeutique possible d'un candidat médicament en utilisant un modèle approprié d'efficacité avant la réalisation des autres projets non cliniques (études de pharmacologie de sécurité et études toxicologiques) et/ou cliniques ultérieurs. Ces études d'efficacité dans un modèle animal peuvent être exigées par les autorités réglementaires pour mettre en évidence les propriétés pharmacologiques d'un candidat médicament.

Ce projet a pour but :

- de valider un modèle d'altérations fonctionnelles et/ou morphologiques du pancréas exocrine induites expérimentalement chez le rat rendu obèse par un régime hyperlipidique.

- d'évaluer l'efficacité d'un candidat médicament sur des indicateurs d'obésité chez le rat obèse et éventuellement d'évaluer l'effet de ce traitement sur le développement d'altérations fonctionnelles et/ou morphologiques du pancréas induites expérimentalement chez le rat obèse.

La fréquence et la durée d'administration sont variables en fonction des candidats médicaments à tester. La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme. Elle pourra être intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, dermale, orale, ou toute autre voie mimant la voie thérapeutique.

Du fait de la complexité que représente un organisme vivant et les interactions des différentes fonctions physiologiques qui le composent, il n'existe aucune méthode alternative in vitro et/ou in silico permettant de s'affranchir totalement de l'utilisation animale.

L'animal choisi est le rongeur car le développement d'une obésité nutritionnelle est possible dans cette espèce et c'est l'espèce utilisée dans les autres études non cliniques.

Dans le cadre de ce projet, le nombre total d'animaux nécessaire sur une période de 3 années est estimé à 294 rats. Il est déterminé, à minima, dans le but d'obtenir des résultats biologiquement et statistiquement représentatifs. Cela permettra d'atteindre tous les objectifs de l'étude d'intérêt tout en limitant, au maximum, le nombre d'animaux impliqué.

Les animaux sont hébergés en groupe en respectant les dimensions demandées par la Directive 2010/63 avec enrichissement. L'état clinique des animaux est contrôlé quotidiennement et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongée. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

**9652** L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. Les principales caractéristiques de l'IR sont des défauts d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux et de la néoglucogenèse hépatique ainsi qu'un défaut de transport du glucose dans le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Les mécanismes à l'origine de l'IR sont mal connus, mais l'hypothèse principale implique un phénomène de lipotoxicité induit par des



accumulations ectopiques de lipides. Ces désordres métaboliques sont associés à une réponse inflammatoire chronique dans les tissus adipeux caractérisée par une production anormale d'adipokines et de l'activation de divers processus pro-inflammatoires. De la même façon la présence d'une IR hépatique, associée à un processus inflammatoire, conduit au développement de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Diseases, maladies hépatiques non alcooliques). Ainsi processus inflammatoires, IR, obésité, diabète de type 2 et NAFLD sont intimement liés.

La forte prévalence des NAFLD n'a fait qu'accentuer l'intérêt porté à cette pathologie ces dernières années. Ainsi différentes méthodes d'imagerie de la pathologie se sont développées afin notamment d'identifier son stade de développement. Toutefois si le diagnostic de la fibrose ou de la stéatose est aujourd'hui réalisable grâce à différentes modalités, le suivi de l'inflammation hépatique de manière non invasive est aujourd'hui impossible. L'inflammation étant au cœur des mécanismes de développement des NAFLD, et ce dès ses stades les plus précoces, il semble pourtant primordial d'être capable de l'évaluer.

Nous nous proposons donc d'évaluer un nouvel agent d'imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique ou SPECT en anglais) spécifique de l'inflammation. Cet agent d'imagerie fait actuellement l'objet d'un transfert en clinique mais pour une indication autre que l'inflammation hépatique, et nous souhaitons déterminer s'il pourrait également avoir un intérêt pour l'imagerie de l'inflammation dans les NAFLD.

Lors d'une précédente étude conduite chez la souris, la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie du foie avec cet agent d'imagerie a été réalisée en utilisant un modèle d'inflammation hépatique aiguë induite par un régime alimentaire MCD carencé en deux acides aminés (la méthionine et la choline). Cette étude a permis de démontrer que l'agent d'imagerie permet effectivement de visualiser et de quantifier de manière non invasive l'inflammation hépatique. A présent que cette preuve de concept a été faite, nous souhaitons poursuivre l'évaluation sur un second modèle murin plus contraignant à mettre en œuvre mais beaucoup plus proche en termes de physiopathologie des NAFLD de celles observée en pratique clinique. L'intérêt d'utiliser ce nouveau modèle animal est double. Premièrement, ce modèle étant proche de la clinique, les données obtenues chez la souris seront plus prédictives de ce qui pourrait être observé chez l'homme. Deuxièmement, il est également plus adapté que le premier modèle utilisé pour évaluer l'effet de thérapies. La présente demande constitue une étude préliminaire afin de valider ou non la possibilité de faire de l'imagerie de l'inflammation hépatique sur ce nouveau modèle animal.

Au total 24 souris seront utilisées.

Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections du radiotraceur selon les bonnes pratiques vétérinaires.

**9653** Les altérations de l'homéostasie métabolique induisent des pathologies telles que l'obésité et le diabète, celles-ci ayant un impact socio-économique majeur. Il est important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués afin de proposer de nouvelles stratégies de traitement aux patients. L'objectif de ce projet de recherche est de détailler les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection et le métabolisme des nutriments dans le foie utilisant les modèles des souris qui miment des pathologies métaboliques humaines. Pour ça, nous allons créer, élever et caractériser les nouveaux modèles des souris transgéniques qui sont caractérisés par la perte de signalisation de la voie l'insuline. Nous utiliserons ces modèles pour effectuer des analyses moléculaires dans le tissu hépatique, pour des analyses en microscopie électronique, pour obtenir des hépatocytes pour des études mécanistiques in vitro et pour effectuer des études métaboliques in vivo dans des cages métaboliques.

Egalement, dans ces modèles nous allons tester les approches des traitements pharmacologiques pour corriger les défauts métaboliques. En conclusion, dans une perspective translationnelle, ce travail pourra permettre de valider de nouvelles cibles dans la voie de signalisation de l'insuline en

tant que marqueur de diagnostic ou de pronostic et de rationaliser les essais futurs de modulateurs de cette voie dans les conditions de dysfonctionnement métabolique.

Dans ce projet, le respect de la règle des 3R est assuré par les procédures mise en œuvre, notamment : l'anesthésie générale des souris pour les procédures pouvant entraîner de la douleur, l'analyse de paramètres multiples chez chaque animal, l'obtention d'animaux contrôles et mutants dans les mêmes croisements, l'utilisation de tests statistiques adaptés. Ce projet de cinq ans utilisera 298 souris.

**9654** L'objectif général de ce projet est d'étudier les mécanismes responsables du développement et du maintien des douleurs neuropathiques, afin de pouvoir identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Pour ce faire, nous nous intéressons à la plasticité du réseau neuronal spinal, qui est connu pour jouer un rôle crucial dans la transmission et l'intégration des informations signalant la douleur.

La douleur est une sensation désagréable mais utile permettant de détecter et d'éviter les stimuli potentiellement nocifs pour notre organisme. Cependant dans certain cas pathologique, tels qu'une lésion nerveuse, la douleur perd sa fonction protectrice et devient invalidante. Ces douleurs dites neuropathiques s'accompagnent d'états d'hyperalgésie (augmentation de l'efficacité d'un stimulus nociceptif) et d'allodynie (situation dans laquelle un stimulus non nociceptif devient douloureux). Chez l'homme, ces douleurs dites douleurs chroniques sont malheureusement résistantes à la plupart des traitements utilisés en clinique. Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant la mise en place et la chronicisation de ces douleurs devrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

La transmission synaptique inhibitrice spinale joue un rôle essentiel dans l'intégration et la modulation des informations nociceptives. Suite à une lésion nerveuse, des changements plastiques mènent entre autre à une diminution de l'inhibition synaptique spinale. Un des mécanismes de cette désinhibition est le changement de l'homéostasie de l'ion chlorure Cl<sup>-</sup> due à une diminution de la fonction du transporteur de l'ion chlorure KCC2 dans la moelle épinière. La phosphorylation de KCC2 est une des voies de régulation de ce transporteur. L'objectif de notre projet est d'étudier l'implication de la phosphorylation de KCC2 dans la sensation douloureuse et plus particulièrement dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques.

Cette étude sera réalisée principalement par une approche électrophysiologique in vitro (patch-clamp sur tranche de moelle épinière de souris), associée à une approche comportementale (évaluation des sensibilités mécanique et thermique). L'ensemble des expériences utilisera 468 souris pour les 3 années du projet. Nous utiliserons un modèle de douleur neuropathique afin d'étudier les changements de gradient chlorure dans cette condition et les possibilités de restaurer ce gradient en condition neuropathique par des approches pharmacologiques.

L'ensemble de ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de réduction, raffinement et remplacement des procédures sur l'animal. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour réaliser les tests statistiques. Aussi, l'analyse des données sera menée au fur et à mesure des expériences et le nombre d'animaux ajusté en conséquence. Les animaux seront maintenus en cage collective avec environnement enrichi. L'ensemble des procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale et des contrôles quotidiens de l'état de santé et du comportement des animaux seront effectués dès lors que l'animal entre en expérimentation. Ce projet portant sur l'étude d'un système intégré et mature, il nous a été impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests in-vitro. Cependant, l'ensemble des études pharmacologiques sera réalisé lors des expériences d'électrophysiologie permettant ainsi de tester plusieurs doses lors d'une même expérience, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

**9655** Le but de ce projet est d'évaluer le bénéfice thérapeutique d'une molécule dans les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Les troubles du spectre de l'autisme regroupent un ensemble de désordres neurodéveloppementaux (dus à des anomalies de développement du système nerveux central) de degrés de gravité variables. Pour les troubles les plus sévères, une approche par traitement pharmaceutique peut être nécessaire. Il n'existe pas à ce jour de traitement efficace.

Les modèles sur cultures de cellules ne permettent pas de modéliser les troubles étudiés, Des études précliniques sont donc nécessaires pour étudier les effets de nouveaux traitements potentiels, sur des modèles animaux reproduisant la maladie.

Cette étude sera réalisée sur des modèles animaux expérimentaux (rats ou souris, mâles et femelles) bien caractérisés dans la littérature. Pour chaque modèle étudié, les animaux effectueront des tests comportementaux mesurant les capacités de communication (communication par ultrasons) et sociabilisation et les effets des traitements étudiés seront ainsi mesurés dans ces tests. Plusieurs tests comportementaux seront utilisés pour le même animal (2 tests), afin de réduire le nombre total d'animaux nécessaires. A la fin de l'étude comportementale, une étude biochimique sera réalisée sur les tissus prélevés afin d'identifier les mécanismes d'action impliqués dans la maladie et dans les effets du composé étudié.

L'autisme est induit chez l'animal soit par administration d'un composé pharmaceutique, dans une fenêtre spécifique de développement, soit sur des animaux transgéniques (qui portent la même anomalie génétique que celles identifiées chez les patients). Nous allons étudier les effets de notre molécule sur 2 modèles animaux : administration du composé au stade gestationnel de 13 jours chez le rongeur, ou administration chez le nouveau-né de 14 jours, chez le rat et la souris. Un modèle transgénique sera également étudié, soit 5 modèles animaux au total.

Le nombre d'animaux que nous prévoyons pour mener à bien ce projet est le nombre minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement analysables, selon les données de la littérature.

Soit, par composé étudié : 5 modèles animaux x 4 groupes (contrôles, autistes non traités, autistes traités composé, contrôles traités nouveau composé) x 3 durée de traitement x 3 doses X 2 (mâles et femelles) 12 animaux par groupe (rat ou souris) = 4320 animaux.

Au maximum 2 composés seront étudiés : la molécule thérapeutique et son dérivé, soit un total de 8640 animaux sur la durée totale du projet.

Les 8640 animaux proviendront des portées de 172 rattes gestantes femelles et 288 souris gestantes femelles. Le nombre total d'animaux est donc au maximum de  $8640+172+288 = 9100$  animaux sur la totalité du projet

Les procédures appliquées dans ce projet n'entraînent pas de souffrance de l'animal (tests de comportement, enregistrements sonores). Les animaux seront hébergés en groupe, avec un enrichissement donné aux femelles pour construire des nids, et surveillés quotidiennement. La survenue d'un état de stress potentiel sera identifiée à l'aide de points limites définis au préalable.

**9656** Les hormones thyroïdiennes (HT) et les glucocorticoïdes (GC) contrôlent de nombreux processus biologiques en régulant l'expression des gènes. Des perturbations de la signalisation de ces deux hormones à la période périnatale sont à l'origine de diverses pathologies qui peuvent se manifester tout au long de la vie et qui constituent des problèmes majeurs de santé publique puisqu'elles concernent le cancer, l'obésité, le diabète, des maladies cardio- vasculaires et métaboliques ainsi que des retards mentaux.

Les travaux de notre équipe ont pour objectifs de caractériser l'effet des GC sur l'expression des gènes contrôlés par les HT.

Pour réaliser ces études nous utilisons comme modèle un amphibien anoure (*Xenopus tropicalis*) qui constitue un modèle classique pour étudier l'action des HT. En effet, il passe de l'état de têtard à l'état adulte au cours d'une période de développement qui est la métamorphose. Cette étape est régulée par les HT et présente de nombreuses similitudes avec la période périnatale chez les mammifères (maturation de nombreux organes en adéquation avec le changement d'environnement, aquatique vers aérien).

Notre projet vise à valider par une méthode indépendante (qRT-PCR), les résultats de nos travaux antérieurs qui ont permis d'établir les profils d'expression de gènes issus de 3 tissus remaniés pendant la métamorphose (l'épiderme de la queue, le membre inférieur et le foie) à partir de têtards traités par les HT et les GC seules ou en combinaison. Ces résultats montraient ainsi l'existence d'interactions entre les deux voies de régulation hormonale.

Pour cette étude, nous mettrons en œuvre une procédure qui consistera à traiter 4 lots de têtards, avec chaque hormone individuellement ou conjointement. Cette procédure nécessitera au total 240 animaux.

Le nombre de têtards considérés correspond d'une part à l'effectif minimum requis pour obtenir la quantité de matériel biologique nécessaire pour réaliser les étapes expérimentales, pour lesquelles le rendement de chaque protocole a été optimisé et d'autre part pour effectuer des analyses statistiques fiables. Un maximum de tissus différents sera prélevé sur chacun des têtards.

Les têtards sont hébergés dans des aquariums où le milieu est rigoureusement contrôlé. L'eau est changée

régulièrement, la température, le pH, la teneur en nitrites et en nitrates ainsi que la conductivité sont vérifiées

quotidiennement. Les animaux sont nourris tous les jours. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et tout animal présentant des signes pathologiques ou comportementaux anormaux (défaut de nage) est euthanasié. En effet, les traitements ne sont pas susceptibles de modifier le comportement des têtards pendant la période expérimentale.

Des modèles ex vivo adaptés à notre projet, tels que des lignées cellulaires, ne sont pas disponibles chez le Xénope, ce qui ne permet pas actuellement de s'affranchir de l'expérimentation in vivo. Cependant, nous restons attentifs à toute innovation qui nous permettrait de remplacer l'expérimentation animale.

De plus, afin de ne pas créer de dommages aux animaux en les manipulant, les traitements hormonaux sont uniquement réalisés en balnéation, par addition d'hormones dans l'eau des aquariums. Le bénéfice attendu dans le cadre de ce projet est une meilleure connaissance du dialogue existant entre les deux voies de signalisation (HT et GC) en fonction du destin cellulaire des tissus et organes, dialogue encore largement méconnu.