



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Résumés non techniques des projets autorisés (58)

5801. La cornée constitue la principale lentille de l'œil, responsable des 2/3 du pouvoir optique, notamment grâce à l'épithélium et au film lacrymal.

Il s'agit d'un tissu normalement transparent et avasculaire, grâce à la production locale de facteurs anti-angiogéniques.

Les ulcères de cornées, fréquents en pratique quotidienne ophtalmologique font le plus souvent suite à une agression mécanique (corps étranger...), thermique, chimique, infectieuse, toxique, par des ultraviolets, des rayonnements lasers.

Il est impératif de prendre en charge précocement un ulcère de cornée en reconstituant la barrière épithéliale afin de limiter ses complications : infection secondaire, taie avec baisse d'acuité visuelle définitive par perte de transparence cornéenne, néovascularisation cornéenne, œdème de cornée par dysrégulation des flux liquidiens intra-cornéens, astigmatisme irrégulier, douleurs handicapantes, descémétocèle ou perforation cornéenne.

Selon le postulat retenu actuellement, les corticoïdes topiques retardent la cicatrisation épithéliale, limitent la fibrose et la néovascularisation cicatricielle cornéenne.

Certains cliniciens traitent donc de façon empirique les ulcères de cornées par corticoïdes pour moduler la cicatrisation, préserver la transparence de la cornée en limitant l'apparition de néovaisseaux et d'œdème. Cette pratique est discutée car certains auteurs ont imputé aux corticoïdes un retard de cicatrisation allant jusqu'à la kératolyse.

Les glucocorticoïdes (GC) se lient aux récepteurs glucocorticoïdes (GR), les minéralocorticoïdes (MC) et les glucocorticoïdes se lient aux récepteurs minéralocorticoïdes (MR). MR et GR appartiennent à la même famille de récepteurs ; cependant, leur affinité à leurs ligands est différente. Les effets cortico-induits peuvent donc résulter en partie de la fixation des GC aux MR.

Les fonctions du MR ne sont pas complètement élucidées au niveau de l'œil et de la cornée.

Il a été montré que l'antagonisme du MR a des effets bénéfiques chez les patients atteints de la chorioretinite séreuse centrale, une forme particulière de l'œdème rétinien.

Une activation excessive du MR dans l'œil pourrait contribuer au développement de l'œdème rétinien en conditions pathologiques en favorisant l'inflammation, stress oxydant et angiogenèse.

Il serait bénéfique d'identifier le rôle du MR dans l'œdème cornéen et la néovascularisation et de proposer éventuellement de nouveaux traitements ciblant le MR.

L'utilisation de l'animal entier ne peut pas être remplacée, car nécessaire pour apprécier les mécanismes physiopathologiques intégrés.

Le modèle de Damato (scrapping épithélial + limbique à 360°) sera utilisé chez 168 souris et 432 rats.

L'utilisation des examens *in vivo* permet d'évaluer la progression de la maladie ou les effets thérapeutiques chez un même animal et de réduire le nombre d'animaux sacrifiés. Les procédures utilisées dans l'étude peuvent entraîner une souffrance modérée pour les animaux. Pour éviter la douleur pendant la procédure, l'anesthésie sera réalisée préalablement. Des soins adéquats ont été prévus et seront mis en place avant, pendant et après chaque procédure. Les points limites précoces ont été aussi prévenus pour réduire la douleur et la souffrance.

5802. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave, progressive et incurable qui se définit par l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire de plus de 25 mm Hg. Le principal symptôme est l'intolérance à l'effort, sous la forme de dyspnée et de fatigue musculaire.

Le modèle rat-monocrotaline est un modèle qui permet de reproduire chez l'animal de manière reproductible et rapide cette pathologie par une administration de monocrotaline (alcaloïde issu d'une plante, *Crotalaria spectabilis*) qui induit de multiples altérations structurales et fonctionnelles des cellules endothéliales des parois vasculaires, aboutissant à une augmentation de la pression artérielle pulmonaire. Les propriétés curatives ou préventives de nouvelles molécules pourront donc être évaluées dans ce modèle après administration chez l'animal.

Un nombre prévisionnel maximum de 1300 animaux sera utilisé dans ce projet sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R:

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur l'hypertension pulmonaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'une molécule. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux 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 effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le suivi des signes cliniques et des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5803. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer la capacité d'un candidat médicament à favoriser la mémoire à court terme chez la souris en utilisant le test de reconnaissance d'objets.

Le test de reconnaissance d'objets est un modèle reconnu de mémoire à court terme chez la souris. Ce modèle est basé sur l'activité exploratoire spontanée des rongeurs et n'implique pas d'apprentissage de règle ou de conditionnement des animaux. Il a été démontré que ce modèle était sensible aux effets de l'âge et à d'autres causes de dégénérescence cérébrale touchant la mémoire.

Le projet consiste à évaluer l'effet de futurs médicaments susceptibles d'améliorer le quotidien des patients souffrant de maladies neurodégénératives, spécifiquement la mémoire à court-terme qui est le type de mémoire touché en premier lors du déclin cognitif des patients Alzheimer. Pour cela, les animaux seront soumis à 2 types de protocoles dans le test de reconnaissance d'objets et sera étudiée :

- la capacité du candidat médicament à retarder le déclenchement de l'oubli, phénomène naturel
- la capacité du candidat médicament à reverser un déficit mnésique induit expérimentalement.

Dans chaque modèle, les effets du candidat médicament pourront être comparés à ceux d'un composé de référence connu pour améliorer la mémoire à court terme dans ce test.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 4320 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

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

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- 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 limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5804. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer la capacité d'un candidat médicament à favoriser la mémoire à court terme chez le rat en utilisant le test de reconnaissance d'objets.

Le test de reconnaissance d'objets est un modèle reconnu de mémoire à court terme chez le rat. Ce modèle est basé sur l'activité exploratoire spontanée des rongeurs et n'implique pas d'apprentissage de règle ou de conditionnement des animaux. Il a été démontré que ce modèle était sensible aux effets de l'âge et à d'autres causes de dégénérescence cérébrale touchant la mémoire.

Le projet consiste à évaluer l'effet de futurs médicaments susceptibles d'améliorer le quotidien des patients souffrant de maladies neurodégénératives, spécifiquement la mémoire à court-terme qui est le type de mémoire touché en premier lors du déclin cognitif des patients Alzheimer. Pour cela, les animaux seront soumis à 2 types de protocoles dans le test de reconnaissance d'objets et sera étudiée :

- la capacité du candidat médicament à retarder le déclenchement de l'oubli, phénomène naturel
- la capacité du candidat médicament à reverser un déficit mnésique induit expérimentalement.

Dans chaque protocole, les effets du candidat médicament pourront être comparés à ceux d'un composé de référence connu pour améliorer la mémoire à court terme dans ce test.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 5400 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

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

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- des conditions environnementales et d'hébergement optimales

- 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
- des points limites adaptés
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5805. L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents produits sur les paramètres cardio-vasculaires chez le cobaye vigile en utilisant la télémétrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 500 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le cobaye car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. 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 cobaye est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- 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
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux

5806. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiellement antipsychotiques d'un candidat médicament chez des rats traités avec de la phencyclidine (PCP), modèle animal permettant de mimer certains symptômes de la schizophrénie.

L'administration de PCP à forte dose chez le sujet sain induit une psychose expérimentale (désorganisation de la pensée, agitation) et certains des symptômes observés dans la schizophrénie (hallucinations, délire...). Suite à cette découverte, l'utilisation de PCP chez l'animal a contribué au développement de modèles animaux de cette maladie. En particulier, chez le rat, les conséquences d'un traitement chronique de PCP constituent un modèle animal reconnu et réversible de cette pathologie. En effet, ces animaux présentent une hyperlocomotion, un déficit social mesurable par le test d'interactions sociales et une dysfonction cognitive mesurable par des tests d'apprentissages et de mémoire. Ces différents aspects correspondent à certains des symptômes de la schizophrénie.

Le projet consiste à évaluer l'effet de futurs médicaments susceptibles d'améliorer le quotidien des patients schizophrènes en réduisant l'intensité des symptômes observés. Pour cela, certains déficits comportementaux observés dans la schizophrénie seront induits chez le rat avec un traitement chronique de PCP, puis la capacité de candidats médicaments à reverser ces déficits sera étudiée en utilisant différents tests comportementaux mesurant notamment leur capacité à interagir socialement (retrait social observé chez les schizophrènes) et leur mémoire à court terme (déficits cognitifs reconnus chez les schizophrènes).

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 11250 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

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

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
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

5807. Malgré des succès récents, la lutte contre le VIH est très loin d'être gagnée. En effet, si les traitements antirétroviraux actuels parviennent à contrôler l'infection au point de rendre le virus indétectable, la persistance à bas bruit de l'inflammation chronique conduit à une morbidité et une mortalité accrues. Cela se traduit par une augmentation des risques de développer des maladies cardiovasculaires, neurologiques, ainsi que de cancers et de vieillissement précoce de l'organisme.

Un des coupables est le virus lui-même qui est maintenu dans l'organisme. En effet, le moindre arrêt des médicaments se traduit par une hausse de la charge virale dans les jours suivants. Pourquoi? Parce que le VIH trouve refuge dans certaines cellules immunitaires appelées réservoirs où il provoque un déséquilibre homéostatique et leur perte. Ces réservoirs viraux se forment très tôt après l'infection et jouent un rôle important dans la pathogenèse. D'ailleurs, la mesure de la taille de ce réservoir, a une valeur pronostique de l'évolution de l'infection.

Il est donc aujourd'hui recommandé de traiter les patients dès la phase aiguë pour réduire ces réservoirs et protéger les cellules cibles. Néanmoins, les patients sont obligés de prendre un traitement à vie sans jamais pouvoir éliminer le VIH. Seule une vingtaine de patients, traités précocement pendant la phase aiguë de l'infection présente un contrôle virologique au long cours après l'arrêt de leur traitement. Ils présentent un niveau de réservoir particulièrement faible et certains voient même leurs réservoirs diminuer alors qu'ils ne reçoivent plus de traitement.

Un médicament d'immunothérapie permettrait de cibler ces cellules réservoirs. Ce médicament existe déjà sur le marché et est utilisée en routine chez l'Homme dans le traitement de maladies auto-immunes chroniques. Une première étude pilote sur deux primates non humain chroniquement infectés a d'ores et déjà été conduite et a donné des résultats prometteurs. En effet, une forte diminution de la virémie a été observée après un traitement de courte durée et cet effet perdure après l'arrêt du traitement.

C'est pourquoi une large étude préclinique sera réalisée afin d'évaluer l'impact du traitement sur la réplication virale, les réservoirs viraux et la pathogenèse.

Ce projet prévoit d'utiliser au maximum 42 primates non humain, nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie sont mis en place lors des méthodes expérimentales, toutes conçues de façon à éviter les souffrances lors des interventions sur les animaux. Les prélèvements de sang sont réalisés par ponction veineuse avec une limitation des volumes de sang prélevés, des prélèvements de fluides et de biopsies seront effectués, les traitements et l'infection se feront par injections. Une attention particulière est apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaire aux traitements). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du « bien-être animal » de l'établissement.

5808. Bien que peu fréquent (entre 0,2 et 0,5% ; ≈ 400 /an en France), l'accident de décompression (ADD) peut entraîner une invalidité permanente (de type hémiplegie, paraplegie ou tétraplegie), voire le décès, et représente ainsi un risque majeur chez le plongeur subaquatique. L'ADD touche non seulement les plongeurs loisir, mais aussi l'ensemble des personnes exposées à des différentiels de pression importants : patients et personnel fréquentant des chambres hyperbares, plongeurs militaires, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers.... Depuis les travaux de Paul Bert, il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine, se comportant comme des corps étrangers. Les paliers de décompression qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD continuent d'être rapportés malgré le respect des procédures de décompression, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

A l'échelle de la population, le risque d'ADD est statistiquement proportionnel à la quantité de bulles circulantes. Cette dernière dépendant à la fois de la quantité de gaz dissous dans l'organisme pendant la plongée et des cinétiques de transfert des gaz dissous entre les différents compartiments de l'organisme : depuis les tissus (où ils sont dissous) jusqu'aux poumons (par lesquels ils sont éliminés). Or, pour une même plongée, la quantité de bulles détectées dans la circulation est variable d'une personne à l'autre. Les raisons de cette forte variabilité interindividuelle restent à ce jour méconnues.

A l'échelle de l'individu, cette relation est beaucoup moins nette, suggérant que la présence de bulles circulantes est nécessaire mais ne suffit pas à déclencher un ADD. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc dépendante de l'intervention des facteurs individuels, innés ou acquis.

L'objectif de ce projet vise à mieux cerner les mécanismes physiopathologiques de l'ADD.

Dans ce but, au cours d'un projet précédent, des rats ont été soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare, puis sélectionnés en fonction de leur résistance à l'ADD afin de dégager une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Les mesures réalisées dans ce projet ne comportent que des prélèvements post-mortem.

Le taux d'ADD ayant diminué de plus de moitié chez les rats sélectionnés, différentes procédures expérimentales sont maintenant prévues afin de caractériser le phénotype et le génotype commun de ces rats résistants. Ainsi, nous chercherons à caractériser leur fonction cardiovasculaire à deux niveaux :

- au niveau de la microcirculation cutanée (réactivité microvasculaire) par Laser Doppler.
- au niveau et de la régulation de la pression artérielle.

Toutes ces mesures seront effectuées sous anesthésie et font l'objet de cette saisine.

Ces analyses physiologiques permettront une meilleure compréhension des mécanismes de la résistance à l'ADD. Ce projet a une durée de 12 mois.

Il impliquera l'utilisation de 52 rats : 20 rats (10 mâles et 10 femelles) de la lignée résistante à l'ADD, 20 rats Wistar classiques (10 mâles et 10 femelles) servant de témoins, ainsi que 12 rats Wistar (6 mâles et 6 femelles) permettant de mettre au point la procédure concernant la mesure de pression artérielle.

Les expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3R :

- il s'agit d'une étude des effets au niveau de l'organisme pour laquelle le remplacement n'est pas possible
- le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum permettant une étude statistique cohérente, et en accord avec le principe de réduction
- le raffinement est respecté au niveau des conditions d'hébergement des animaux et au niveau des procédures d'anesthésie / analgésie.

5809. Un des enjeux de la pharmacopée est de découvrir de nouvelles molécules destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les produits naturels et synthétiques, d'une incroyable diversité moléculaire, sont des outils pharmacologiques essentiels pour la recherche fondamentale et représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques.

Néanmoins, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique, si son principe actif n'est pas capable de franchir des barrières biologiques complexes ou s'il est dégradé par des enzymes. Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une préparation pharmacologiquement active est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs. La détermination des paramètres pharmacocinétiques (temps nécessaire pour atteindre le pic plasmatique, temps de demi-vie, cinétique d'élimination du composé, ...) est réalisée à partir de prélèvements sanguins effectués à différents temps après l'administration du composé. Par ailleurs, il est également possible de déterminer la concentration du principe actif dans l'organe cible.

Ce projet vise à évaluer, *in vivo*, le comportement pharmaco-cinétique de nouvelles préparations pharmacologiquement actives dans le cadre de traitement contre certaines infections à *E. coli* responsables de pathologies graves pour lesquelles il n'existe aucun antidote. Ces bactéries produisant des toxines de Shiga sont pathogènes pour l'homme et sont responsables de diarrhées, de colites hémorragiques et du syndrome urémique hémolytique qui en est la complication majeure. Le recours à l'animal est ici indispensable car aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut aujourd'hui reproduire la complexité de la pharmacocinétique d'un composé chez le mammifère. Le rongeur est un modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation clinique chez l'Homme. Le projet prévoit le recours à 980 rongeurs 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.

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.

5810. La sérothérapie est le seul traitement spécifique des envenimations scorpioniques. Aujourd'hui encore, les anticorps constituant les anti-venins sont d'origine équine. Ils sont obtenus après purification du sérum d'animaux hyperimmunisés et utilisés après fragmentation des anticorps sous forme de Fab ou de Fab'2 polyclonaux. Les sérums antivenimeux sont hétérogènes et leur pouvoir protecteur variable reste souvent faible. L'administration de ces préparations comporte très souvent des risques d'effets secondaires : réactions d'hypersensibilité, choc anaphylactique, maladie sérique.

Ce constat a conduit au développement de nouveaux formats d'anticorps issus de l'ingénierie moléculaire, capables de neutraliser spécifiquement les neurotoxines à l'origine de la toxicité du venin. Les fragments d'anticorps recombinants sont plus homogènes que les anti-venins conventionnels et parfaitement caractérisés en termes d'activité spécifique. Leur méthode d'obtention élimine le risque de transmissions par des agents transmissibles non conventionnels.

Les résultats précédemment publiés ont mis en évidence le pouvoir protecteur de deux fragments d'anticorps, capables de neutraliser les trois neurotoxines dangereuses du venin du scorpion *Androctonus australis Hector*, présent en Tunisie et en Algérie. Les objectifs sont maintenant d'améliorer les qualités des fragments d'anticorps et de développer des fragments d'anticorps contre la neurotoxine responsable de la toxicité du venin du scorpion *Buthus occitanus*. L'intérêt final est donc de pouvoir créer un anti-venin polyvalent. En effet, les deux espèces de scorpions *Androctonus* et *Buthus* partagent le même biotope, et il est souvent difficile de voir ou d'identifier le scorpion responsable de la piqûre.

Pour ce double objectif, le nombre estimé d'animaux serait de 468 souris en respectant au mieux la règle des 3 R :

1/Remplacement : À ce jour, aucune méthode de substitution au modèle animal ne peut être mise en place pour valider l'effet protecteur des fragments d'anticorps du fait qu'il n'existe aucun système *in vitro* permettant de reproduire la pharmacologie des toxines ou des fragments d'anticorps.

2/Réduction :

Vu la nature des expériences, les lots seront extrêmement réfléchis pour limiter le nombre d'animaux. D'une part, des études *in vitro* sont réalisées au préalable pour vérifier les qualités des fragments d'anticorps (affinité, ...) et seuls le (s) meilleur(s) seront testés. D'autre part, toutes les souris d'un même lot ou tous les lots ne seront pas forcément envenimés/traités en même temps afin de pouvoir s'adapter petit à petit aux résultats observés.

3/Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes, en animalerie A2 à raison de 5 souris maximum par cage de 530 cm² (365x207x140mm) sur des portoirs ventilés et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger) lors de la réception des animaux jusqu'au début des expériences.

5811. L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémetrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémetrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le chien vigile en utilisant la télémetrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 160 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. 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 recommandée pour ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémetrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi de signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux

5812. En élevage bovin laitier, un des problèmes majeurs des vingt dernières années est la faible fertilité des vaches laitières hautes productrices (avec seulement 36,8% de réussite à l'insémination artificielle chez les vaches de race Prim'Holstein en 2012) qui entraîne d'importantes conséquences financières pour tous les acteurs de la filière. La fertilité constitue un caractère complexe et les échecs de gestation ont des origines multifactorielles comprenant l'aptitude des femelles à exprimer des chaleurs nettes et régulières, à produire des gamètes de qualité, à assurer un environnement physiologique compatible aux étapes de fécondation et de développement embryonnaire... De nombreuses études sont menées pour comprendre et améliorer chacune de ces étapes du processus de reproduction (génétique, développement d'automates...) et notamment celles portant sur le développement de solutions nutritionnelles adaptées. Ce projet consiste à évaluer les effets d'un complément nutritionnel à base de plantes permettant de participer à la maîtrise des cycles sexuels chez la vache ou la génisse laitière sans recours aux hormones exogènes. Ce complément nutritionnel est issu de l'évolution d'une spécialité disponible commercialement et déjà utilisée en élevages bovins sous forme de bolus. Pour cela, différentes composantes de l'aptitude reproductive (cyclicité, dynamique folliculaire, niveau de progestérone plasmatique, qualité des ovocytes...) de 10 génisses de race Holstein recevant ou non le complément alimentaire seront évaluées. Le protocole expérimental, qui comprend deux procédures classées comme légères, respecte la règle des 3R:

Remplacement: aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* n'étant à ce jour disponible concernant les caractères mesurés, le recours à l'animal est nécessaire.

Réduction: Cette étude préliminaire possède un caractère exploratoire et vise à identifier sur quel(s) paramètre(s) les bénéfices peuvent être attendus avant d'envisager une étude de plus grande envergure. Le dispositif expérimental a été conçu en carré latin où chaque animal constitue son propre témoin, permettant ainsi de réduire au maximum les effectifs nécessaires.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (10 m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière le cornadis pour le confort des aplombs accès à des brosses latérales et dorsales). De plus, un anesthésique local sera administré permettant une situation de confort optimum de la femelle pour les prélèvements d'ovocytes.

5813. Les maladies cardio-vasculaires présentent un enjeu important pour la médecine dans nos sociétés, maladies qui présentent la première cause d'hospitalisation après 65 ans. Il est constaté chez ces patients que la circulation des coronaires (vaisseaux sanguins du cœur) est altérée, et c'est pourquoi, il est impératif de trouver des moyens de caractériser un changement des paramètres vasculaires. Le développement de la coronarographie et de l'angioplastie (techniques de visualisation et de modification des coronaires) permet aujourd'hui de mesurer le débit des coronaires par la technique de la thermodilution. Cette

technique basée sur la proportionnalité entre la température et le débit permet d'évaluer l'ensemble des coronaires. C'est une méthode de référence fiable et reproductible chez l'Homme.

Le but de notre projet est d'étudier le mécanisme d'adaptation de la coronaire lors de la mesure par la technique de la thermodilution. Ce projet doit confirmer et quantifier nos observations faites chez des patients. Ces mécanismes passent très probablement par la production de nitrite d'oxyde par l'endothélium (couche la plus interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang). Mesurer le débit coronaire par la technique de la thermodilution pendant une coronarographie pourrait donc apporter des informations importantes sur le bon fonctionnement de l'endothélium, et à terme, cette méthode de mesure pourrait être un index de risque cardiovasculaire, d'athérosclérose, de spasme coronaire et une évaluation ciblée de certaines thérapeutiques.

Notre projet prévoit d'utiliser 30 porcs. La fréquence cardiaque, la taille du cœur, l'anatomie coronaire, l'innervation, la circulation collatérale native du porc sont très proches de celle de l'Homme. Le plan général du projet est d'anesthésier les animaux, de pratiquer une chirurgie afin de tester différentes situations de débit coronaire (après un blocage pharmacologique, après une destruction mécanique, et après injection de microsphères), et d'enregistrer les modifications de débits par la technique de thermodilution, modifications contrôlées par une sonde posée directement autour de la coronaire.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, car les différentes modifications projetées envers l'endothélium ne peuvent être effectuées chez l'Homme. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux tout en effectuant le nombre nécessaire de tests de mesure de débits. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôlent régulièrement l'état de santé des animaux. Ils seront hébergés selon les normes en cours, et nous veillerons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être avant et au cours de l'expérimentation.

5814. Nous avons récemment identifié un nouveau facteur de transcription qui pourrait représenter une cible inexplorée pour les thérapies contre le cancer. Nos données préliminaires démontrent que la modulation de ce facteur affecte la morphologie cellulaire, la capacité de différenciation et le taux de prolifération des myoblastes normaux. Son interaction avec l'ADN semble jouer un rôle important dans la régulation de la transcription des cellules musculaires et pourrait être associée à des événements précoces conduisant au cancer via la dérégulation du génome, la reprogrammation du devenir cellulaire et la perte de contrôle de la différenciation. En conséquence, nous avons détecté un niveau élevé de cette protéine dans le rhabdomyosarcome (RMS), cancer dérivé du muscle squelettique. Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de cette protéine pourrait être impliquée dans le conditionnement du devenir des cellules tumorales, en particulier dérivées de rhabdomyosarcome et avons développé une molécule inhibitrice de cette protéine. *In vitro*, nous avons observé une importante mort cellulaire dans toutes les lignées de rhabdomyosarcome testées. Ce résultat, très prometteur, nous incite maintenant à valider cette stratégie dans des modèles de xéno greffes tumorales dérivées de rhabdomyosarcome dans l'objectif d'améliorer ensuite la formulation de notre molécule pour une application clinique. Les inhibiteurs du facteur de transcription ZNF555 développés sous forme de vecteurs lentiviraux ont montré une activité importante *in vitro*. Elle s'est traduite par une mort cellulaire significative de toutes les lignées de rhabdomyosarcome que nous avons évaluées. Pour poursuivre le développement de ces molécules et mieux comprendre leur mécanisme d'action, il est indispensable de confirmer leur activité dans des modèles de xéno greffes des cellules étudiées mais également des modèles de xéno greffes dérivées de patients, qui ont la spécificité de mieux conserver les caractéristiques biologiques et moléculaires des tumeurs de patients, comparés aux modèles dérivés de cellules.

Dans cette étude, nous utiliserons 2400 souris. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous explorerons l'inhibition de la protéine étudiée dans deux xéno greffes dérivées des lignées, préalablement testées *in vitro*, et dans deux xéno greffes dérivées de patients (PDX) atteints de rhabdomyosarcome pour mieux représenter l'hétérogénéité de ce type de tumeur et le nombre d'animaux sera limité à 10 animaux porteurs de tumeurs par groupe et tous les groupes seront comparés entre eux à l'aide d'une analyse statistiques non paramétriques de type Kruskal-Wallis. Pour valider la poursuite du développement de notre molécule, il nous a été demandé de confirmer son activité *in vivo* dans une stratégie de succès ou arrêt.

Tous les moyens seront mis en œuvre pour améliorer le bien-être des animaux pendant l'étude. Toutes les injections seront réalisées après application d'un anesthésique local, les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un analgésique post-opératoire. Les souris seront hébergées en groupe et leur environnement sera enrichi avec du « cocoon ». Chaque étape devra être validée et significative pour passer à la suivante. Un échec lors d'une étape entraînera l'arrêt du protocole.

5815. Le risque de mort subite (ou SUDEP pour Sudden and Unexpected Death in Epileptic Patients) est trois fois plus élevée chez les patients épileptiques que chez une personne saine. Il est maintenant certain qu'une mort subite chez un patient épileptique est toujours précédée d'une crise convulsive généralisée, manifestation spectaculaire bien connue de la crise épileptique. Les facteurs de risques de la SUDEP semblent relever d'une implication cardiaque, respiratoire et cérébrale. Mais il n'est pas connu si le fait de faire une crise convulsive généralisée non létale augmente la probabilité que la prochaine crise le soit. Notre projet vise à lever cette hypothèse sur un modèle souris de SUDEP en induisant des crises d'épilepsie plusieurs jours consécutifs sur des mêmes sujets. Il existe un modèle de SUDEP chez la souris correspondant à une crise épileptique induite en appliquant un stimulus sonore particulier qui peut être possiblement suivie du décès (crise audiogène). Notre projet consiste à induire 5 convulsions généralisées durant 5 jours consécutifs sur des animaux et d'observer si la létalité augmente en fonction des jours. Car il faut savoir qu'il est possible de diagnostiquer le caractère létal de la crise tout en sauvant l'animal dans les quelques secondes qui suivent la crise en mettant ces animaux sous respirateur. Chaque animal sera donc testé à la crise audiogène 5 jours consécutifs et sauvé si besoin était pour assurer le bon déroulement du protocole. Ainsi, nous pourrions quantifier l'évolution du pourcentage de décès en fonction du nombre de crises déjà présentées. Il n'est pas envisageable d'utiliser une approche *in vitro* en remplacement de l'approche *in vivo* dans ce projet. Nous souhaitons inclure dans ce projet, 45 souris qui seront testées durant 5 jours. Ce chiffre

est motivé par le fait qu'il s'agit d'une variable qualitative (décès ou non) et donc un plus grand nombre d'animaux est nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le raffinement des procédures a été pris en compte pour limiter la souffrance de l'animal avec une détermination précise des points limites

5816. La toxoplasmose a un double impact en santé humaine et en santé animale. Chez l'homme, elle est la deuxième cause de malformations congénitales, après la trisomie 21. Dans le domaine animal, elle est responsable de pertes économiques en élevage ovin et caprin, par les avortements qu'elle provoque. La consommation de mouton infecté représente la cause principale de la toxoplasmose humaine, première zoonose alimentaire en France.

L'observation qu'une primo-infection protège contre une réinfection permet d'envisager raisonnablement une stratégie vaccinale contre le parasite. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin humain contre la toxoplasmose et seul un vaccin vivant est commercialisé contre les avortements chez la brebis.

De nombreux essais de vaccination montrent des protections significatives mais encore insuffisantes, d'où la nécessité de développer des stratégies d'optimisation.

Pour cette étude, le nombre maximal de souris à prévoir sur 5 ans est de 4480. Ce nombre est surestimé car toutes les préparations vaccinales ne suivront pas le processus complet et de plus, nécessitent un temps de préparation qui limiteront le nombre possible à tester en 5 ans.

Les études seront bien sûr faites dans le respect des 3 « R » :

1/Remplacement : Des études *in vitro* sont réalisées au préalable pour vérifier les qualités des préparations vaccinales (intégrité des protéines, affinité, test cellulaire *in vitro*...).

2/Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet pour une campagne complète est réduit au minimum sans toutefois compromettre les objectifs.

Le chiffre est cependant surestimé puisque :

- le temps de développement/production des différentes préparations vaccinales envisageables est assez long (6 mois environ) et probablement que sur 5 ans seule la moitié des campagnes prévues théoriquement sera réalisée.

- de plus, pour les préparations vaccinales peu efficaces, seule la première phase (phase A) sera réalisée.

3/Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes, en animalerie A2 sur des portoirs ventilés et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Aucun traitement ne sera administré, car les médicaments disponibles peuvent interférer avec notre étude de la réponse immunitaire.

5817. Le cancer est à ce jour la seule pathologie chronique majeure pour laquelle la plupart des patients sont obligés de se rendre à l'hôpital pour recevoir leur traitement. Pour les autres pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, l'asthme, le diabète ou le VIH, le patient se procure son traitement à la pharmacie la plus proche et gère de manière autonome la prise de son traitement. Cette différence est liée à la voie d'administration des médicaments. Pour les maladies précitées, ils sont disponibles sous forme de comprimés, d'inhalations, voire d'injections sous-cutanées comme l'insuline pour les diabétiques. Pour la majorité des anticancéreux, ces voies d'administration simples qui rendent le patient autonome pour son traitement, n'existent pas. Ils doivent être administrés par perfusions intraveineuses qui se déroulent sur plusieurs heures. Celles-ci se font soit sur une voie veineuse centrale avec pose d'une chambre implantable, soit par perfusion veineuse périphérique. Elles nécessitent une reconstitution du produit à la pharmacie de l'hôpital et la pose par une infirmière. De plus, sachant que les anticancéreux doivent être administrés à intervalle régulier toutes les 1 à 3 semaines, ce mode de prise en charge est contraignant pour le patient, d'autant plus qu'il est généralement assez rare d'avoir un hôpital spécialisé dans le traitement du cancer à proximité du domicile. Cette prise en charge a aussi un coût important lié à la complexité du circuit et des problèmes organisationnels se posent car le nombre de patients atteints de cancer est en constante augmentation. Le développement de nouvelles voies d'administration qui soient faciles d'utilisation est donc primordial pour permettre la prise en charge du patient à domicile. Deux voies d'administrations sont principalement utilisées dans ce but : la voie orale et la voie sous-cutanée (SC). La première est certainement la plus développée car elle a l'avantage d'être facile d'utilisation avec les formes comprimés ou gélules. Son inconvénient principal est que la biodisponibilité (quantité de principe actif qui se retrouve dans le sang) est faible, variable et difficilement prévisible. Ces problèmes ont limité l'utilisation de ces formes orales. Nous pensons sur ce point que la voie SC est supérieure à la voie orale car elle permet une biodisponibilité plus élevée et mieux contrôlée.

Notre but est de développer une nouvelle approche permettant d'administrer efficacement les chimiothérapies déjà présentes sur le marché par voie SC et non par voie intraveineuse. L'utilisation de systèmes nanoparticulaires (c'est-à-dire de taille nanométrique) pour transporter les principes actifs offre des solutions potentielles pour le développement de traitements qui soient plus efficaces et moins toxiques pour le patient.

Pour cela, nous développons une nouvelle technologie de prodrogue polymère s'assemblant en nanoparticules ce qui permet d'améliorer l'absorption des molécules par voie SC.

Cette technologie consiste à coupler chimiquement le principe actif (PA) à un polymère innovant afin de modifier les propriétés physico-chimiques de la molécule thérapeutique et ainsi maximiser son absorption. Les études seront de 2 types : pharmacocinétique et innocuité sous cutanée :

• Les études d'innocuité par voie sous cutanée nous permettront de vérifier que nos prodrogues polymère évitent les effets irritants et nécrosants au niveau du tissu sous cutané.

• Les études de pharmacocinétique nous permettront de vérifier que les prodrogues polymère ont une meilleure biodisponibilité (passage du site d'injection vers le sang) en comparaison avec la molécule commerciale administrée par voie SC. Elles

permettront aussi de vérifier qu'il est possible d'avoir une exposition au principe actif comparable à la voie intraveineuse, pour avoir une efficacité égale.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'innocuité SC et de la pharmacocinétique par cette voie d'administration. Durant leur transport dans l'organisme depuis le site d'administration, les médicaments sont soumis à une métabolisation hépatique, rénale etc...qui peut provoquer l'apparition de métabolites issus de la dégradation pouvant être plus ou moins actifs voire toxiques. La réponse d'un organisme entier n'est à l'heure actuelle pas remplaçable par une modélisation ou une analyse *in vitro*. Il est donc indispensable d'évaluer la concentration en principe actif dans le sang et l'effet de ceux-ci localement au niveau du tissu SC et sur animal entier pour tenir compte de ces phénomènes.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seul un nombre limité de formulations seront testées *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de l'étude de pharmacocinétique nous utiliserons 1056 souris sur 3 ans. Des points limites d'expérience ont été identifiés en amont de la mise en place de ce projet afin de limiter la douleur et le mal-être des animaux.

5818. Malgré de nombreuses recherches et publications, il est difficile d'établir le mécanisme fondamental de la genèse des crises épileptiques chez l'homme. Chez des patients épileptiques, le métabolisme du glucose est diminué, et la concentration du glycogène dans le cerveau est augmentée. Les perturbations dans les systèmes de neurotransmission et dans le métabolisme du glycogène chez des patients épileptiques peuvent être la cause des crises épileptiques. Pour répondre à cette problématique, le modèle des crises induites par la méthionine sulfoximine chez le rongeur est un modèle pertinent d'épilepsie, car ces crises ont une ressemblance avec celles observées chez l'homme.

Le but de ce projet est de déterminer les effets anticonvulsivants d'un produit dans différents modèles chez le rongeur.

Le déclenchement des crises est un processus physiologique complexe. Un modèle *in vitro* ou l'utilisation de cultures de cellules ne sont pas pertinents, car le déclenchement des crises est régulé par de nombreux neuromédiateurs différents libérés par les différents types cellulaires présents dans le système nerveux central.

Le nombre d'animaux utilisé (souris ou rat) est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire de 10 animaux par dose étudiée. Le nombre de doses étudiées est de 4 à 6 au plus par produit, et elles sont déterminées en fonction de résultats précédents ou de données de la littérature, pour réduire le nombre d'animaux utilisés, soit 60 animaux par produit. Au maximum, 10 produits seront étudiés par an, soit 600 animaux au plus par an, et 3000 animaux au plus pour la durée maximale du projet.

La souffrance des animaux sera réduite au minimum à l'aide des points limites. Ils seront hébergés dans un environnement enrichi et des analyses rétrospectives seront réalisées régulièrement (1 fois par an) pour raffiner le modèle.

Le but de ce projet sera de déterminer l'intérêt d'un produit pour prévenir ou réduire l'apparition des crises épileptiques. Ce projet appartient à un axe de recherche dans le domaine du système nerveux central pour déterminer l'intérêt anticonvulsivant d'un produit.

5819. Dans le cadre de la production et de la réalisation de contrôles qualité de ses produits (vaccins et sérums), la société doit disposer de réactifs issus de prélèvements de tissus sur animaux, lorsqu'il n'existe aucune alternative de produits de synthèse.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur, d'autre part, d'assurer la production de vaccins conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication et enfin, d'obtenir la mise sur le marché de nouveaux vaccins répondants aux enjeux de santé publique.

Les prélèvements réalisés sur les animaux sont des prélèvements de sang. Le sang est ensuite retraité et permet, selon le besoin, d'obtenir du plasma, du sérum, du sang total non coagulé ou des globules rouges. Le sang sert à fabriquer ou à contrôler les vaccins. Les animaux donneurs peuvent être immunisés au préalable afin d'obtenir du sérum hyper immun, nécessaire au contrôle de certains produits.

Pour ce faire, avant d'être prélevés, les animaux reçoivent des injections d'antigènes (équivalent à des vaccins) ce qui provoque chez eux une réaction immunitaire et donc la production d'anticorps. Ces anticorps sont ensuite présents dans leur sérum obtenu après un prélèvement de sang.

Le nombre d'animaux concernés pour toute la durée du projet (5 ans) est de 76 ovins, 6 caprins, 50 mini porcs 4 équins, 15 oies, 50 dindes et 1500 poules domestiques. Le choix de l'animal (espèce, âge) est déterminé par l'utilisation du réactif. Il existe toujours une spécification technique entraînant le choix. Les niveaux de souffrance sont légers ou sans réveil pour les animaux non immunisés, léger ou modérés pour les animaux hyperimmunisés.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Lorsque l'état de la science et les autorités de santé le permettent, les tissus d'origine animale sont remplacés. Le remplacement n'est à ce jour pas possible pour les produits concernés par ce projet.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum, de façon à répondre à la demande de façon optimum. Une sensibilisation des utilisateurs finaux est réalisée, afin d'éviter tout gaspillage de réactif. Dans le cas de la production de sérums hyper immuns sur ovins ou caprins un prélèvement terminal est envisagé afin de recueillir une grande quantité de sérum, limitant ainsi le nombre d'animaux nécessaire. Dans ce cas, une anesthésie puis une euthanasie sont réalisées.

Raffinement :

Les quantités de sang prélevées sont toujours inférieures aux recommandations réglementaires. Les prélèvements sur poules domestiques sont terminaux. Les animaux sont placés sous anesthésie générale profonde et la récolte du sang est maximisée. L'animal est ensuite euthanasié par une injection létale d'un produit homologué. Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Les prélèvements sont réalisés sur animaux en parfaite santé.

5820. Ce projet s'inscrit dans le développement préclinique d'une molécule candidat médicament. Il a pour objectif principal d'étudier les effets de cette molécule sur la fonction cardiovasculaire chez le rat et le cobaye anesthésiés. Pour ce faire, la pression artérielle, la pression ventriculaire gauche, et l'électrocardiogramme (ECG) seront mesurés et enregistrés en continu pendant toute la durée de l'expérience. D'autres paramètres cardiovasculaires pourront également être mesurés tels que la pression pulmonaire, pression veineuse centrale ou périphérique, débits veineux ou artériels. En plus des paramètres cardiovasculaires, l'anesthésie sera monitorée avec mesure des gaz du sang et de la saturation en oxygène. La molécule à tester pourra être administrée avant anesthésié de l'animal ou après anesthésie et instrumentation. Des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement pendant l'expérience pour évaluer l'exposition des animaux à la substance administrée et/ou à ses métabolites.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1440 rats et 1440 cobayes sur 5 ans.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat et le cobaye car il n'existe pas de méthode de substitution (expérience *in silico* ou *in vitro*) pour étudier l'effet d'un candidat-médicament sur la fonction cardiovasculaire des animaux. 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.

Réduction : Un nombre minimal et homogène 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.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un monitoring complet de l'anesthésie
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi des signes cliniques et des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

5821. Les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) font partie des pathologies de l'anxiété. Les personnes qui en sont victimes sont confrontées à des pensées préoccupantes qui reviennent sans cesse (obsessions). Elles sont contraintes, pour les chasser ou les empêcher de survenir, de se livrer à des rituels particuliers (compulsions). Les causes des troubles obsessionnels compulsifs sont encore mal connues. Les hommes et les femmes sont atteints de façon à peu près égale. On estime qu'une personne sur cinquante a été ou sera touchée une fois dans sa vie, de façon plus ou moins durable. La maladie commence le plus souvent à l'adolescence ou au début de l'âge adulte.

Un déficit d'activité d'un gène codant pour une protéine serait associé à différentes pathologies neuropsychiatriques. Un modèle animal est basé sur ce principe et met en jeu des souris "knockout" ou souris KO. Le but de ce projet est d'évaluer les modifications comportementales induites par la modification génétique et ainsi mieux comprendre l'implication de l'activité de la protéine codée par ce gène dans des troubles obsessionnels compulsifs et les comportements agressifs et antisociaux. Pour cela au cours de chaque étude de ce projet, les souris génétiquement modifiées seront testées successivement dans une batterie de 9 tests comportementaux (visant à évaluer la sociabilité des animaux, leur capacité mnésique, les modifications physiologiques liées à la mutation...)

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 219 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement: dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier l'impact d'un gène sur un organisme dans sa globalité. À ce jour, la souris est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera 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
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

5822. Aiguë, la douleur est vitale. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, la douleur n'offre plus aucun avantage et provoque au contraire détresse et souffrance. Inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par deux types de symptômes: des douleurs spontanées, continues ou paroxystiques et des douleurs provoquées, par une stimulation

normalement douloureuse (exagération de la douleur ou hyperalgésie) ou non (allodynie). Les traitements disponibles aujourd'hui ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires. Il est donc essentiel d'élucider les mécanismes des douleurs chroniques pour découvrir des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments. L'un des symptômes douloureux les plus fréquents est l'allodynie mécanique. Comment le tact devient-il douleur ?

Le sous-noyau caudal (SnC) du complexe sensitif du trijumeau et la corne dorsale de la moelle épinière reçoivent les informations somato-sensorielles des nerfs périphériques qui innervent la peau et les tissus profonds de l'extrémité céphalique, pour l'un, et du reste du corps, pour l'autre. Ces afférences nerveuses primaires se terminent à différents niveaux du SnC/corne dorsale en fonction de leur modalité : celles véhiculant les informations nociceptives dans les couches superficielles (I et II externe), et celles véhiculant les informations tactiles dans les couches profondes (II interne (Iii) – V/VI). Les neurones de la couche I sont à l'origine de l'une des voies principales de transmission de l'information douloureuse du SnC/corne dorsale vers le cerveau. Normalement, ces neurones ne reçoivent que des informations provenant des afférences nociceptives. En conditions pathologiques, cependant, ils peuvent aussi recevoir et donc transmettre au cerveau des informations provenant des afférences tactiles. Le cerveau recevant une information tactile par une voie nociceptive l'interprète comme une douleur : c'est l'allodynie mécanique.

On sait maintenant que les informations tactiles sont transmises des couches profondes du SnC/corne dorsale aux neurones de la couche I via un circuit exciteur polysynaptique. Normalement masqué, ce circuit devient actif par suite de phénomènes de plasticité. Un élément clé de ce circuit est un interneurone particulier de la couche Iii, contenant la sous-unité gamma de la protéine kinase C (PKC γ). Or l'inactivation de la PKC γ supprime et, inversement, son activation déclenche une allodynie mécanique, indiquant que l'activation de la PKC γ intervient dans la plasticité responsable de l'allodynie mécanique. Cependant, intervient-elle seulement dans l'induction et/ou aussi dans le maintien de cette plasticité? La réponse à cette question est indispensable pour apprécier l'intérêt thérapeutique, préventif et/ou curatif, d'un traitement de l'allodynie mécanique par un antagoniste PKC γ .

Nous utiliserons un modèle d'allodynie mécanique faciale durable (>2 semaines) chez le rat provoquée par l'injection d'adjuvant complet de Freund (CFA). Par des techniques d'immunomarquage, nous évaluerons l'activation des interneurones PKC γ au niveau du SnC après injection de CFA, correspondant au maintien de l'allodynie.

Aucune méthode alternative ne permet de remplacer ce protocole. Il est nécessaire de réaliser ces études *in vivo*, car l'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique (fibres). Il est donc nécessaire de réaliser les observations comportementales chez l'animal. Des études comportementales sont nécessaires pour mettre en évidence l'installation de l'allodynie mécanique. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Les animaux seront réceptionnés le mardi de chaque semaine. Les animaux seront ensuite stabulés dans des pièces ventilées, thermorégulées (22 ± 1 °C) avec hygrométrie contrôlée et accès à la nourriture et à l'eau ad libitum). Pour les études de comportement, les animaux seront soumis à des séances d'habituation pendant 4 jours avant l'expérience afin de diminuer les stress liés à un nouvel environnement et à la manipulation par l'expérimentateur. Les jours suivants l'injection, l'animal sera surveillé (alimentation, boisson et mouvement) pour s'assurer de son bon état sanitaire. Si un changement de comportement (réduction d'activité, pelage mal entretenu, animal prostré dans un coin de la cage, perte de poids) est observé, l'animal sera euthanasié. La douleur sera diminuée à son maximum lors de l'évaluation de la sensibilité cutanée car les stimulations seront de faible intensité et de courte durée.

Au total 30 rats seront utilisés dans ce projet. 3 groupes sont nécessaires pour cette étude : un groupe contrôle recevant une solution saline et ayant une stimulation, un groupe contrôle recevant le CFA mais pas de stimulation et le groupe CFA ayant une stimulation.

5823. L'infarctus du myocarde est la mort (nécrose) d'une zone plus ou moins étendue du muscle cardiaque (myocarde). Les cellules musculaires cardiaques de ce territoire, qui ne sont plus alimentées par le sang, ne parviennent plus à se contracter par manque d'apport en oxygène, meurent en quelques heures.

À leur place, le tissu musculaire cardiaque se transforme en tissu fibreux : c'est la fibrose du myocarde. La zone du cœur concernée perd sa capacité de contraction. Pour compenser ce déficit, les cellules cardiaques saines s'élargissent, le cœur grossit. L'ensemble de ces phénomènes de modifications géométriques, structurales, cellulaires et moléculaires subies par le cœur au cours d'un processus pathologique définit le remodelage cardiaque. Son évolution peut se faire vers l'insuffisance cardiaque qui est l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme.

Il a été suggéré qu'une mise en veille du cœur détérioré pourrait permettre d'induire un « remodelage inverse » du ventricule gauche pour limiter, voire corriger, le phénomène de remodelage.

Il a été montré que la transplantation cardiaque hétérotopique (TCH), c'est-à-dire la greffe d'un cœur sur un autre site anatomique, permet de mettre au repos un cœur infarcté et ainsi de créer les conditions de décharge myocardique permettant d'abaisser sa capacité fonctionnelle à un niveau résiduel. Ce qui permettrait de favoriser la réparation tissulaire post-infarctus.

Nous souhaitons mener une étude expérimentale de greffe cardiaque et cardio-pulmonaire en position abdominale afin de créer les paramètres spécifiques du repos myocardique sur 28 jours. Il s'agit d'une étude exploratoire sur 70 animaux avec des mesures fonctionnelles d'imagerie par échographie 1 fois par semaine pendant toute l'étude et avant la mise à mort des animaux, une étude hémodynamique permettra d'évaluer la fonction cardiaque de façon plus complète.

Le modèle de rat Lewis est utilisé pour ses caractéristiques de consanguinité permettant une greffe hétérologue (greffe entre deux animaux sans problème de rejet). Il permettra de comprendre les processus physiologiques rencontrés en clinique grâce à ses similitudes en terme d'hémodynamique et de morphologie cardiaque. Le modèle utilisé a été validé et utilisé dans ce champ

d'application et nous permet une extrapolation des données physiopathologiques à la pratique clinique. Il est donc nécessaire de travailler sur un organisme entier et vivant.

Le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique est déjà en place dans notre structure. Notre expérience permet de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre total d'animaux sera de $n=70$ permettant des résultats statistiquement exploitables.

Choisir avec soin le modèle animal utilisé en prenant en compte l'état actuel des connaissances, avec amélioration des conditions d'hébergement des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être, est primordial. Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) mais aussi les méthodes utilisées (méthodologie opératoire très bien maîtrisée en microchirurgie selon les techniques dérivées de la clinique humaine, anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) permettent de réduire, supprimer et soulager l'inconfort, la douleur, la détresse et l'angoisse subies par les animaux et d'obtenir plus d'informations pertinentes (raffinement de la méthodologie).

5824. Les Ganglions de la Base (GB) sont un ensemble de structures profondes du cerveau. Leur dysfonctionnement suite à une perte de dopamine est depuis longtemps connu pour être responsable des troubles du mouvement de la maladie de Parkinson. Il est cependant de plus en plus évident qu'un dysfonctionnement des GB est également présent dans de nombreux troubles du comportement. Cela inclut les troubles obsessionnels compulsifs, le syndrome de Gilles de la Tourette, l'hyperactivité avec troubles de l'attention, les addictions aux drogues, ainsi que les troubles des impulsions (jeu pathologique, boulimie, hypersexualité) présents (en plus des troubles du mouvement) chez les patients parkinsoniens. La compréhension des dysfonctionnements à l'origine de ces troubles ainsi que la capacité de moduler les activités de ces structures cérébrales par des approches thérapeutiques comportementales, pharmacologiques ou de neurostimulation sont devenues des enjeux majeurs pour améliorer les traitements de ces patients exprimant ces différentes formes de troubles de l'impulsivité.

Les travaux sur le *Macaca fascicularis* ont déjà permis le développement de nouveaux agents pharmacologiques dans la maladie de Parkinson mais aussi le développement de la stimulation cérébrale profonde appliquée à des troubles psychiatriques tels que les troubles obsessionnels compulsifs. Notre objectif est de permettre ce même développement dans le syndrome de Gilles de la Tourette et les formes les plus graves de troubles du contrôle des impulsions, actuellement sans traitement efficace. Les principaux objectifs de ce projet fondamental mais à finalité clinique sont de déterminer 1) les bases neuronales de la diversité des formes d'impulsivité par enregistrements d'activités de certaines structures des GB, 2) l'influence des modulations dopaminergique et sérotoninergique sur l'activité de ces structures ainsi que sur l'impulsivité et 3) les effets sur l'impulsivité de la stimulation d'une petite structure des GB, le noyau sous-thalamique, bien connu pour être la meilleure cible pour supprimer les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Pour répondre à ces 3 questions, 4 *Macaca fascicularis* (nombre minimal d'animaux permettant une généralisation des effets) seront exposés à une série de procédures de sévérité légère (entraînement à une tâche comportementale permettant de mesurer les 3 principales formes d'impulsivité cognitive, d'action et motivationnelle puis examens de neuroimagerie) à modérée (enregistrements neuronaux, perturbations pharmacologiques réversibles par voie d'injection générale ou locale directement dans les GB, puis micro-stimulation intracérébrale réversible pour déterminer l'implication du noyau sous-thalamique dans le contrôle des impulsions).

Le primate non-humain est irremplaçable de par sa proximité anatomo-fonctionnelle avec l'homme mais le raffinement de nos approches d'investigations (l'utilisation de l'imagerie cérébrale pour identifier les territoires des structures étudiées, la réversibilité des effets comportementaux produits ainsi que l'utilisation d'approches non-lésionnelles) nous ont permis de réduire le nombre d'animaux, d'améliorer leur bien-être durant la phase expérimentale et de maintenant envisager une sortie de protocole sans sacrifice.

5825. Les déficits fonctionnels du pharynx et du larynx (en particulier l'hémiplégie laryngée) sont fréquents chez le cheval. Ils ont pour conséquence l'apparition d'un bruit et d'une intolérance à l'effort, qui limite fréquemment les performances du cheval atteint. Le traitement conventionnel est chirurgical avec la pose de prothèse, mais les complications sont fréquentes. Par analogie avec la chirurgie humaine, d'autres techniques plus physiologiques ont été récemment développées, comme la ré-innervation du larynx et même l'implantation d'une électrode de stimulation du muscle déficient ou du nerf réimplanté. Pour une meilleure efficacité, ces interventions devraient être suivies par une phase de rééducation utilisant des techniques passives et actives de remise en fonctionnement des structures lésées.

Ce projet est la première étape d'un plus vaste projet dont l'objectif est de déterminer les conditions d'exercice les plus favorables à l'activité des muscles extrinsèques du larynx et sous-hyoïdiens afin de proposer des protocoles de rééducation optimale après une chirurgie du larynx ou du pharynx. L'objectif de cette étape est de déterminer la méthode la plus fiable et la plus facile à mettre en œuvre pour enregistrer l'activité des muscles d'intérêt (omo-hyoïdien et sterno-hyoïdien). Pour ce faire, deux techniques électromyographique (EMG) doivent être comparées : l'acquisition d'un signal transcutané (EMG de surface) vs l'acquisition d'un signal après insertion d'une électrode fine dans le muscle concerné (chirurgie mini-invasive réalisée sur cheval debout sous sédanalgésie et anesthésie locale).

Le protocole sera mis en œuvre chez 3 chevaux adultes indemnes d'affection laryngée. Le cheval constitue l'espèce cible (remplacement impossible). Le nombre de 3 sujets avec enregistrement simultané de l'activité EMG des muscles gauches et droits est le minimum pour vérifier la faible variabilité individuelle attendue. Dans un premier temps, l'activité des muscles d'intérêt sera évaluée par EMG de surface lors d'un effort standardisé (paliers de vitesse) au trot sur tapis roulant. La technique d'acquisition de données lors de l'exercice sur tapis roulant est déjà maîtrisée par notre laboratoire. Cet exercice sera répété trois fois par cheval pour vérifier la répétabilité du signal obtenu. Dans un second temps, des électrodes EMG seront implantées sous anesthésie locale

dans les muscles d'intérêt et les chevaux répèteront le même protocole d'exercice. A l'issue de l'étude, les implants seront retirés et les chevaux pourront reprendre une vie normale.

5826 Le lymphome est une pathologie cancéreuse dont la fréquence a énormément augmenté ces 40 dernières années. Il se traduit par le développement de tumeurs au sein des ganglions et de la moelle osseuse. Dans une tumeur, les cellules tumorales sont au contact d'autres cellules. Ces cellules, appelées cellules du microenvironnement, peuvent augmenter la prolifération des cellules malignes. Malgré des avancées thérapeutiques notables le lymphome reste à l'heure actuelle incurable.

Ce projet a pour but de développer un modèle pertinent de lymphome humain permettant d'étudier les effets de certaines cellules du microenvironnement sur le développement tumoral.

Ce projet consiste à co-implanter dans des souris en sous-capsulaire rénale des cellules humaines de lymphome avec différents types de cellules humaines présentes dans le microenvironnement tumoral. Afin d'éviter un rejet de greffe par la souris, et ainsi potentialiser la prise de greffe, nous utiliserons des souris immunodéficientes (sans système immunitaire).

Description de l'enchaînement des procédures expérimentales : nous évaluerons dans un premier temps l'effet de différents types de cellules du microenvironnement sur la croissance tumorale d'une lignée de lymphome. Une fois le modèle optimal trouvé nous modifierons les cellules du microenvironnement pour évaluer l'effet de ces modifications sur le développement tumoral. Puis nous validerons nos résultats en utilisant des cellules de patients atteints de lymphome. Enfin, en réalisant une greffe à long terme, nous évaluerons dans ce modèle le potentiel métastatique des cellules tumorales.

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

- le Remplacement: le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement de soutien. Ce microenvironnement n'est pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

- la Réduction: ce projet comprend 510 souris car il nécessite de tester un grand nombre de paramètres différents :

- les cellules tumorales implantées : une lignée de lymphome versus des cellules B issues de patients atteints de lymphome,
- le type d'implantation : cellules tumorales seules ou co-implantées avec des cellules humaines du microenvironnement,
- les supports de greffe: gel de collagène ou éponge de collagène,
- l'origine des cellules du microenvironnement : tissu adipeux, moelle osseuse, organe lymphoïde secondaire (amygdales et ganglions),
- la modification de l'expression de certaines molécules par les cellules du microenvironnement,
- la propriété des cellules tumorales à migrer vers d'autres organes et donc à métastaser.
- il faut également comptabiliser tous les lots de souris « contrôle » indispensables à la réalisation de cette étude (souris non implantées = 10).

Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire permettant de garantir des résultats statistiquement fiables.

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

5827. L'objectif de ce projet vise à former des étudiants de 3ème cycle et des médecins gastroentérologues et/ou hépatologues à diverses procédures et gestes chirurgicaux chez le modèle porcin. Ce projet pédagogique s'insère dans un dispositif plus vaste de formation et a été validé par les instances impliquées (université, hôpital, institut de recherche). La formation réalisée reposera sur l'expertise de chirurgiens spécialisés en chirurgie viscérale et digestive, en collaboration avec des personnels scientifiques et techniques formés à l'expérimentation animale et à la chirurgie sur modèle porcin. Deux programmes de formation seront mis en place, dont l'un destiné à des étudiants de 3ème cycle en chirurgie viscérale et digestive, et l'autre à la formation continue de chirurgiens praticiens. La formation destinée aux étudiants de 3ème cycle visera l'apprentissage de gestes chirurgicaux classiques lors d'une chirurgie par laparotomie ou laparoscopie (8 animaux par an pour 16 étudiants formés). La formation continue destinée aux médecins portera sur la transplantation de foie et/ou de rein (6 animaux – 3 donneurs et 3 receveurs – par an pour 12 médecins formés). Le nombre total d'animaux utilisés par an sera donc de 14 porcs conventionnels de 30-40 kg, mâles et/ou femelles (soit 70 animaux sur 5 ans). Ce dispositif de formation à la chirurgie expérimentale sur modèle porcin a été établi de manière à respecter les réglementations françaises et européennes en vigueur, et notamment de manière à répondre à la règle des 3R. REMPLACER : cette formation en chirurgie expérimentale sera faite sur modèle porcin car cette espèce, très proche de l'Homme en termes d'anatomie et de physiologie digestive, est la plus adaptée pour l'apprentissage des gestes chirurgicaux devant être exécutés chez l'Homme. REDUIRE : le nombre d'animaux utilisés pour cette formation a été réduit au minimum satisfaisant pour garantir un confort d'intervention tout autant pour les personnes chargées de veiller à la préparation, anesthésie et analgésie des animaux, que pour les étudiants et médecins devant se former (de 2 à 4 personnes formées par animal opéré). Toute addition de séances ou d'animaux supplémentaires fera l'objet d'un avenant à la présente saisine. « RAFFINER » : l'anesthésie et l'analgésie durant les interventions ont été conçues pour supprimer la douleur induite par une chirurgie viscérale et la manipulation de l'appareil digestif. Brièvement, une pré-anesthésie sera induite par injection intramusculaire de kétamine, puis l'anesthésie sera poursuivie par inhalation d'isoflurane immédiatement avant intubation. Un niveau chirurgical d'anesthésie sera ensuite maintenu par isoflurane délivré par un respirateur mécanique à pression positive. Le volume courant sera ajusté de manière à ce que la spCO₂

mesurée par capnométrie infrarouge soit inférieure à 5%. L'analgésie au cours des interventions sera réalisée par l'administration en perfusion de Fentanyl.

5828. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde avec plus de 17 millions de morts par an. La maladie coronaire est responsable de la moitié de ces décès. Cette pathologie se caractérise par la présence de lésions athéromateuses dans la paroi des artères coronaires, qui irriguent le cœur. En pratique clinique, 2/3 des accidents coronaires aigus sont causés par la rupture de plaques vulnérables. La formation de ces plaques vulnérables est peu sténosante, donc indétectable par les techniques actuellement disponibles en pratique clinique. Développer des traitements pour empêcher le développement de ces plaques d'athérome est donc un enjeu majeur actuellement et de nombreuses études visant à réguler l'inflammation responsable de ces plaques ont déjà été réalisées.

Le Ticagrelor est un traitement antiagrégant plaquettaire couramment utilisé dans l'infarctus du myocarde, et des études récentes mettent en évidence des possibles effets pléiotropes de ce médicament via des interactions avec le métabolisme de l'adénosine. Ces effets pourraient ainsi diminuer l'inflammation au niveau des plaques d'athérome sans que cela soit prouvé pour le moment. L'objectif de cette présente étude est d'évaluer l'effet du traitement par Ticagrelor, administré par gavage, sur la taille et l'inflammation des plaques d'athérome de souris déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), en utilisant un marqueur de plaque instable développé et validé par notre laboratoire. Ce traitement sera comparé au Prasugrel (autre antiagrégant utilisé couramment en clinique) et à un placebo. Ces souris ApoE^{-/-} (45) seront nourries avec un régime hyperlipidémique pour permettre le développement des plaques d'athérosclérose. Une étape préalable de détermination des doses d'antiagrégants nécessaires pour obtenir une antiagrégation comparable dans les deux groupes traités sera réalisée sur un groupe de 24 souris C57Bl/6J traitées par différentes doses de Ticagrelor ou de Prasugrel.

Tout au long des protocoles *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Pour le remplacement, aucune méthode alternative n'est disponible à ce stade du projet, puisque notre objectif est de mesurer la formation de plaques d'athérome dans la paroi artérielle. Pour la réduction, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal, soit un total de 69 souris utilisées, nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement analysables dans les différents groupes expérimentaux. Enfin pour le raffinement, les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Les tests d'antiagrégation seront réalisés après anesthésie par un mélange Ketamine/xylazine puis euthanasie par exsanguination. Les sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), supplémentée par un mélange Air – O₂. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire. Cette imagerie est non-invasive, elle peut donc être répétée au court du temps (imagerie longitudinale), permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux nécessaire.

5829. A l'heure actuelle, la schistosomiase est considérée comme la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme et demeure une maladie tropicale négligée. L'absence de vaccin ainsi que l'émergence de souches de parasites susceptibles/résistantes au Praziquantel (unique médicament actuellement efficace sur toutes les souches de Schistosome) motivent notre intérêt pour la biologie du parasite. Le cycle de ce parasite est donc entretenu dans notre laboratoire dans le but de fournir du matériel parasitaire pour la recherche.

Le schistosome est un parasite helminthe se localisant essentiellement dans l'intestin. Les œufs pondus par les vers femelles assurent la pérennité du cycle lorsqu'ils se retrouvent dans le milieu extérieur (eau douce, 20-25°C) par leur éclosion. Les miracidiums, larves nageuses ciliées libérées des œufs, infestent à leur tour un mollusque d'eau douce *Biomphalaria glabrata* (hôte intermédiaire). Après 30 jours, les furcocercaires sont alors expulsés par les mollusques et vont infester le mammifère (hôte définitif).

Quant aux œufs piégés dans les tissus, ils sont à l'origine de la pathologie (formation de granulome).

Pour ce faire, des hamsters Syriens mâles, utilisés comme hôte définitif, sont infectés avec des furcocercaires de *S. mansoni*. Après 45 jours, les hamsters sont sacrifiés afin de récupérer les vers adultes mais également le foie à partir duquel les œufs du parasite sont extraits. Ceux-ci sont ensuite utilisés pour assurer la pérennité du cycle, grâce à un élevage de mollusques que nous entretenons au laboratoire.

Dans ce projet, nous estimons le nombre maximum d'hamsters utilisés à 2080 sur 5 ans. Ce nombre d'animaux pourra être réduit au cours du projet si les besoins de la recherche en matériel parasitaire sont atteints. Dans le but de veiller au bien-être animal et dans un souci de raffinement de nos expériences, nous avons décidé de stopper nos études 45 jours après l'infestation puisque qu'au-delà, celle-ci et les pathologies associées induisent des douleurs et des souffrances chez l'animal qui sont dues notamment à la ponte des œufs ainsi qu'à leur rétention dans les tissus. Pour finir, au cours de l'infestation, les animaux seront suivis quotidiennement et ceux manifestant des signes de souffrance et de mort très proche seront mis à mort immédiatement.

5830. La fibrose est au cœur des maladies fibro-prolifératives de nombreux organes, notamment le cœur, le foie, les reins et les poumons. La fibrose progresse au fur et à mesure que les cellules s'assemblent en un tissu conjonctif fibreux excessif, qui conduit finalement à une défaillance de l'organe touché. Cette maladie est incurable en raison d'un manque important de connaissances sur les stimuli qui entraînent l'apparition et la progression de la fibrose, ainsi que sur la façon d'inverser le processus, une fois la pathologie diagnostiquée.

Les tissus sains sont vascularisés de façon normale. La mise en place d'une matrice provisoire va être initiée suite à des blessures au niveau de ces tissus, au sein de laquelle l'angiogenèse (production de nouveaux vaisseaux sanguins) va avoir lieu pour réparer le système vasculaire endommagé. Dans certaines conditions pathologiques, cette guérison est entravée et l'angiogenèse en est altérée.

Dans les conditions pro-fibrotiques, l'absence d'une vascularisation fonctionnelle favorise les événements conduisant à la fibrose. La matrice extracellulaire (ou ECM) constitue donc plus qu'un cadre structurel de soutien pour l'adhésion et la migration des cellules. Il fournit une plate-forme pour intégrer l'action des facteurs de croissance, chimiotactiques, immunomodulateurs et angiogéniques dans les tissus, en régulant leur distribution, leur activation et leur biodisponibilité.

Dans cette étude, nous nous focaliserons sur une protéine de la matrice extracellulaire, la ténascine-C, un acteur majeur de la fibrose. Pour déterminer comment la ténascine-C contribue au microenvironnement péri-cellulaire en forçant les cellules vers l'angiogenèse ou la fibrose, nous disposerons d'un modèle d'angiogenèse *in vitro*, consistant en l'analyse de la germination d'anneau aortique, prélevé sur des souris et mis en culture sous différentes conditions expérimentales au préalable.

Le tissu aortique sera donc préparé à partir de souris sauvages adultes (WT) et de souris ténascine-C knockout (TNCKO), pour étudier l'angiogenèse en présence normale et en absence de la protéine d'intérêt.

Nous étudierons 10 conditions expérimentales différentes dans le modèle d'anneaux aortiques *in vitro*, comprenant des anticorps bloquants et des médicaments chimiques (comme par exemple des inhibiteurs pour les protéases et les kinases), en utilisant 2 souris par condition (pour générer les anneaux). Un groupe de 20 souris WT et un groupe de 20 souris TNCKO seront donc nécessaires pour l'ensemble de l'étude (soit 40 souris au total).

Remplacer:

Le modèle animal est nécessaire pour générer des anneaux aortiques frais.

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir générer assez de matériel (anneaux aortiques) pour l'ensemble de l'étude.

Raffiner :

Les animaux sont vérifiés tous les jours. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimums par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité. Les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau filtrée.

Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs bien que le phénotype TNCKO ne soit pas dommageable, elle serait immédiatement sacrifiée.

5831. Ce projet innovant vise à découvrir de nouveaux rôles d'une protéine clé impliquée dans la maladie d'Alzheimer, la protéine précurseur de peptide amyloïde (APP). En effet, alors qu'il est bien connu que le peptide amyloïde s'agrège sous forme de plaques séniles dans le cerveau des patients malades, la fonction de son précurseur, l'APP, qui lui ne s'agrège pas dans la maladie est peu connue. Nous chercherons quel rôle peut jouer l'APP dans la communication entre les neurones du cerveau, c'est-à-dire dans la neurotransmission. Nous postulons que le dérèglement des fonctions de l'APP dans la neurotransmission, en plus de son rôle en tant que précurseur des plaques séniles, participe à la pathologie de la maladie d'Alzheimer. 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 ou bien le remplacerons par divers mutants dans les neurones étudiés avant d'analyser si la communication entre les neurones est perturbée par l'absence d'APP ou l'expression d'un mutant. 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 souris anesthésiées par une procédure appelée « chirurgie stéréotaxie ».

Chaque semaine, une session de chirurgie stéréotaxique sous anesthésie et analgésie permettra d'injecter des 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. Les animaux seront surveillés chaque jour de la semaine suivant la chirurgie tant qu'ils ne seront pas rétablis. Leur observation permettra de détecter tout animal en souffrance. Les animaux incapables de récupérer qui atteindraient les points limites (mauvaise apparence du pelage, dos voûté, troubles du comportement, perte de plus de 20% du poids mesuré le jour de la chirurgie) seront mis à mort pour mettre un terme à leur souffrance.

Tout au long du projet, nous appliquerons la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). (1) 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. (2) 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). (3) Des protocoles expérimentaux simples avec un nombre limité de conditions seront employés (raffinement). 715 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet essentiel à une meilleure compréhension de la maladie d'Alzheimer.

5832. Une tumeur du sein constitue l'apparition d'une grosseur palpable au niveau du sein qui provient du développement anormal du tissu mammaire. Le cancer du sein est donc une tumeur maligne de la glande mammaire. Autrement dit, c'est un cancer qui naît dans les cellules dont la fonction est de sécréter le lait. Il apparaît essentiellement chez la femme, avec 89 cas pour 100 000 (le

cancer du sein survient 200 fois moins souvent chez l'homme, qui possède lui aussi des seins, bien qu'atrophiés). 500 000 femmes meurent chaque année de ce cancer dans le monde selon l'OMS.

5 à 10 % de ces cancers ont une origine génétique héréditaire ; 85 à 90% des cas (forme dite sporadique ou non-héréditaire) ont des origines environnementales mal comprises. Une proportion importante des cancers du sein sporadiques est induite par des traitements hormonaux chez les femmes présentant une prédisposition à ce type de cancer. Certains choix de mode de vie (alcool, régime gras, obésité, manque d'exercice physique) ou gynécologiques (première grossesse tardive, absence d'allaitement, etc.) favorisent aussi ce cancer.

L'objectif de cette étude est d'étudier le mécanisme d'action d'un composé immunostimulant ayant montré une efficacité anti-tumorale significative sur le développement de tumeurs mammaires induites chez le rat femelle. La femelle est privilégiée compte-tenu de la prévalence du développement de ces cancers chez la femme. Le traitement effectué et proposé est préventif afin de pouvoir proposer des solutions de prévention aux femmes ayant des cancers d'origine génétique ainsi qu'aux femmes ayant des facteurs de risque environnementaux importants comme l'exposition régulière à des produits chimiques ou un mode de vie augmentant le risque. La première étude a permis de montrer que le composé testé stimulait le système immunitaire et qu'il permettait ainsi de retarder l'apparition des tumeurs mammaires, leur nombre, leur taille et leur degré de malignité en agissant directement sur les cellules tumorales. Le but de cette deuxième étude est d'étudier le mécanisme d'action par lequel ce composé agit contre le développement des tumeurs mammaires. Des animaux induits et non induits seront mis à mort à des temps réguliers afin d'effectuer des dosages de marqueurs circulants au niveau du sang, de différents organes (foie, rate, reins, intestins, ganglions, poumons, cœur, thymus, ovaires, cornes utérines, vagin et cerveau) et surtout au niveau des tumeurs mammaires développées pour étudier l'expression de gènes (petite portion de patrimoine génétique) impliqués dans le développement tumoral et la prolifération des cellules tumorales et dans l'expression de récepteurs aux hormones, le développement du cancer du sein étant dépendant du taux d'hormones ou hormono-dépendant, en comparaison avec le tissu mammaire sain. Une analyse histologique des tumeurs mammaires sera également effectuée pour mettre en parallèle l'expression de ces gènes et récepteurs par rapport à leur degré de malignité.

Quatre-vingt-seize (96) rats femelles seront réparties en 3 groupes de traitements (un groupe sans induction de tumeur servant de contrôle et 2 groupes avec induction de tumeurs) et traitées pendant 9 mois, 5 jours sur 7, par une injection intrapéritonéale (reproduisant une injection dans le ventre pour la femme) avec 2 produits : un placebo et un produit immunostimulant ayant montré dans une précédente étude une efficacité anti-tumorale (procédure 1). Les tumeurs mammaires sont induites 2 semaines après le début des traitements par une administration orale unique d'un composé chimique ciblant le tissu mammaire (procédure 2). Un suivi du développement des tumeurs est effectué chaque semaine et des prélèvements de sang sont effectués régulièrement pour vérifier les paramètres sanguins et également des marqueurs immunitaires (procédure 3). Le poids des animaux est mesuré 2 fois par semaine et un suivi des prises alimentaire et hydrique est effectué une fois par semaine tout au long de l'expérimentation. La mise à mort des animaux est effectuée par injection d'une surdose d'anesthésique à différents temps après l'induction des tumeurs mammaires : 8, 16, 24 et 32 semaines, avec 8 animaux par groupe pour chaque temps de mise à mort.

. Les résultats des études précédemment réalisées sur ce modèle d'induction de tumeurs mammaires (ne pouvant être effectuées sur des modèles *in vitro*) (Remplacement), ont permis de démontrer que le nombre d'animaux prévu par groupe et par temps de prélèvement pour cette étude, 8 rats, permettra d'obtenir des résultats significatifs (Réduction). Les animaux seront placés à deux par cage (48 x 27 x 20 cm) pendant toute la durée de l'étude, sans enrichissement comme pour la première étude pour ne pas influencer sur l'induction des tumeurs mammaires et sur les paramètres mesurés au cours de l'étude (l'enrichissement pouvant modifier la production de marqueurs circulants et la physiologie générale des animaux). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, taille des tumeurs importante ou des tumeurs interférant avec la locomotion des animaux, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entraînera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement)

Cette étude présente un enjeu socio-économique certain compte-tenu de l'incidence des cancers du sein chez la femme dans le monde. Le composé testé chez le rongeur pourrait ensuite être testé chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à des traitements moins coûteux et surtout avec peu ou pas d'effets secondaires associés.

5833. La radiothérapie (RT) est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants (dit aussi "rayons" ou "radiations") pour détruire les cellules cancéreuses. Actuellement, plus de 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie à une étape de leur parcours de soin. Des études ont démontré que la RT était capable d'induire une réponse immunitaire bénéfique pour l'efficacité du traitement. Cette réponse impliquerait des cellules effectrices du système immunitaire (ex. lymphocytes T CD8+) qui, une fois activées, détruiraient les cellules cancéreuses. Dans certains cas, la RT peut également diminuer la croissance tumorale en dehors de la zone d'irradiation. En oncologie, ce phénomène est désigné par « effet abscopal ». Les mécanismes régissant l'effet abscopal n'ont pas été entièrement élucidés, mais impliquerait également le système immunitaire.

Les nanoparticules (NPs) sont des objets de diamètre compris entre 1 et 100 nm. Dans ce projet, les nanoparticules testées sont inertes et conçues pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages aux tissus sains. En effet, leurs propriétés physiques leur permettent de générer de très importantes quantités d'électrons lors de leur exposition aux radiations ionisantes, amplifiant ainsi la dose d'énergie létale déposée dans la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie est donc démultipliée sans changer la dose de rayons-X.

L'objectif de cette étude est de démontrer le rôle des lymphocytes T CD4+, CD8+ et/ou des cellules Natural Killer (NK) dans la réponse anti-tumorale chez des souris traitées par une combinaison RT + NPs, comparé à la RT seule. Pour cela, une étude

abscopal sera réalisée (c'est-à-dire utilisant des souris porteuses d'une tumeur sur chaque flanc, dont une seule sera traitée). Certains groupes d'animaux seront préalablement privés de lymphocytes T CD4+, CD8+ ou NK à l'aide d'anticorps spécifiques de ces populations cellulaires. En fonction des différents traitements, ces groupes déplétés seront comparés à des groupes non-déplétés.

Pour cette étude, il est indispensable d'utiliser des modèles *in vivo* immunocompétents, seuls capables de reproduire la complexité du développement tumoral et de la réponse immunitaire dans le contexte d'un organisme entier, avec toutes les interactions possibles. Le modèle de cancer chez les souris immunocompétentes a donc été choisi avec soin en se basant sur la bibliographie existante et est largement utilisé pour l'étude de traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en oncologie et en immunothérapie. La lignée cellulaire cancéreuse d'origine murine de cancer du côlon a été choisie. Les groupes testés et le nombre d'animaux utilisés pour ces études ont été choisis avec soin et limités au strict minimum afin de réduire autant que possible la quantité d'animaux utilisés tout en garantissant la robustesse des études. Toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie, les animaux seront observés quotidiennement, et les points limites strictement appliqués.

Au total, un maximum de 480 souris pour cette étude pourra être nécessaire afin de répondre aux objectifs précédemment cités.

5834. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet du fractionnement de la radiothérapie (nombre de séances de rayons) sur la croissance tumorale dans un premier temps et sur la réponse immunitaire anti-tumorale dans un second temps.

Le but de cette étude est de démontrer que la modulation de la dose par séance et du nombre de séances peut induire un effet différent sur la réponse immunitaire anti-tumorale même si la dose totale délivrée reste la même.

Nous analyserons l'effet de quatre schémas de radiothérapie sur la progression des tumeurs sous-cutanées (pour analyser l'efficacité du traitement), en utilisant des cellules murines de colon CT26 greffées au-dessus de la patte arrière droite. Afin d'analyser la part de l'effet propre aux rayons sur les cellules tumorales (telles que les cassures double brins de l'ADN...) et la part de l'effet du système immunitaire anti-tumoral, les expériences seront menées en parallèle sur des souris immunocompétentes (Balb/c) et sur des souris immunodéficientes (Balb/c Nude), qui sont des modèles décrits dans la littérature pour étudier la croissance de tumeurs CT26

Pour la première partie de l'étude 180 souris Balb/c et 108 souris Balb/c Nude seront utilisées pour suivre la progression des tumeurs sous-cutanées. Pour la seconde partie, 180 Souris Balb/c seront nécessaires pour évaluer l'effet des traitements sur l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale à partir d'échantillons biologiques (sang, tumeurs...) prélevés 10 à 15 jours après traitement sur des souris euthanasiées.

Les souris immunocompétentes seront réparties par groupes de 10 individus et les souris immunodéficientes par groupe de 6 individus. L'implication du système immunitaire dans l'efficacité du traitement entraîne une variabilité plus importante des résultats. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir plus d'animaux dans ce groupe. Ces répartitions prennent en compte la variabilité de chaque modèle et les effectifs choisis permettront d'obtenir des résultats robustes avec une bonne puissance statistique comme nous l'ont démontrées des études précédentes et des données de la littérature. Les expériences seront toutes réalisées 3 fois afin d'obtenir des résultats fiables.

La croissance des tumeurs sera évaluée trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et les souris seront mises à mort lorsque les tumeurs auront atteint 1500mm³ ou lors d'apparition de signes de souffrances. Lors de la seconde partie de l'étude les souris seront mises à mort quelques jours après traitement (le jour sera fixé selon les résultats de la première étape) et les prélèvements biologiques seront réalisés afin de doser différents paramètres de l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces afin d'éviter toute souffrance des animaux.

Les tests statistiques adaptés et l'expérience d'études précédentes nous ont permis de réduire les groupes d'animaux à 6 ou 10 individus par groupe, selon la souche les types de souris, et de ne devoir répéter que trois fois les expériences pour chaque étape. Pour chaque expérience 20% d'animaux supplémentaires seront greffés afin de constituer des groupes de souris de volumes tumoraux comparables. Pour chaque expérience et chaque modèle 5 groupes de souris (un contrôle et 4 schémas de traitement différents) seront évalués.

Si cette première étude apporte des résultats innovants, une seconde étude sera réalisée avec un autre modèle de tumeur en implantant des tumeurs de mélanome B16-OVA sur des souris immunocompétentes (C57 BL/6) et immunodéficientes (SCID) (qui sont des modèles décrits dans la littérature pour étudier la croissance de tumeurs B16-OVA) en utilisant des effectifs de souris similaires à la première partie de l'étude et des conditions expérimentales identiques.

Etant donné que nous allons évaluer l'effet des modalités d'administration de la radiothérapie sur la réponse immunitaire, il nous est nécessaire de réaliser notre étude sur des modèles animaux. Les souris seront maintenues dans des cages de 8 à 10 individus en présence d'enrichissement. Les irradiations seront réalisées sous anesthésie gazeuse et aucune toxicité n'est attendue aux doses utilisées. Cependant si des signes de douleur sont observés (animal prostré, tumeur nécrosée, perte de poids), les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse.

Les résultats obtenus permettront de fixer un schéma d'administration de RT propice à l'association de la RT avec des immunothérapies de type inhibiteurs de check point (anti-PD1 ou anti-PDL1) qui sont actuellement évalués dans de nombreux essais et dont les effets sont prometteurs.

Un nombre maximal de 940 souris seront utilisées dans ce projet.

5835. Le syndrome métabolique (Smet) est considéré aujourd'hui comme une véritable épidémie mondiale, avec des conséquences dramatiques sur la santé humaine. Il émerge des changements drastiques dans notre alimentation, concomitants à la réduction de l'activité physique. Il se caractérise par un ensemble de signes cliniques comme une adiposité abdominale, une

dyslipidémie, une glycémie à jeun élevée et une hypertension. Il semble que la prévalence du Smet soit corrélée à la consommation de fructose, en considérable augmentation depuis les années 70. Le Smet est un facteur de risque majeur du développement du diabète et de ses complications comme la rétinopathie diabétique (RD) qui touche 30 à 40% des patients diabétiques. A ce jour, des modèles incomplets de syndrome métabolique ont été mis en place mais aucun n'a inclus un facteur clé comme l'hyperlipidémie pour caractériser les conséquences fonctionnelles et structurelles sur la rétine. Jusqu'à présent les régimes enrichis en fructose ont permis de mettre en évidence une modification précoce de certains gènes du stress oxydatif et la présence d'altérations dans la rétine avant même qu'une insulino-résistance ou qu'un diabète ne soient installés. Cette donnée suggère des nouvelles cibles à atteindre pour une meilleure prévention des dysfonctions des cellules rétinienne et de leurs conséquences.

Aussi, pour tester cette hypothèse, nous souhaitons caractériser les mécanismes intrinsèques liés aux prémices de la rétinopathie diabétique en terme de stress oxydatif, d'inflammation et de profil lipidique, suivi par une complémentation alimentaire à base de curcuma et carnosine comme moyen de prévention. Ce projet sera mené de manière cinétique (8 jours, 1 mois, 3 mois) selon 4 conditions nutritionnelles (standard, enrichi en fructose et lipides, standard + curcuma/carnosine, fructose/lipide + curcuma/carnosine). Différents paramètres électrophysiologiques, physiologiques, biochimiques et structurels permettront d'évaluer les modifications de la rétine suite à un régime pro-diabétogène qui induira stress oxydatif, inflammation et hyperlipidémie. Cette étude nécessitera l'utilisation de 8 animaux par condition de régime, de temps (et d'expériences ERG/angiographie pour le lot à 1 mois), soit un total de 160 animaux.

La mise en œuvre du projet s'inscrira dans la règle des 3R.

Remplacer :

La rétine est un tissu neurosensoriel composé de l'association de plusieurs types cellulaires. Le fonctionnement coordonné de tous ces types cellulaires assure la fonction globale de la rétine, et à l'inverse un dysfonctionnement d'un type cellulaire ou de l'environnement de ceux-ci peut être à l'origine du développement d'une pathologie. De plus les régimes diabétogènes induisent un état d'inflammation, de stress oxydatif qui ont des conséquences sur l'ensemble de la rétine, ainsi que sur l'organisme entier. Ainsi, dans une démarche d'étude de la physiopathologie des animaux ou les interactions entre les différents acteurs sont essentielles, seul un modèle animal peut rendre compte de ces modifications sur un plan global.

Réduire :

Ce projet, incluant un total de 160 rats repose sur la mise en place d'un régime pro-diabétogène et d'un moyen de prévention des conséquences de celui-ci par une complémentation alimentaire à base de Curcuma et carnosine. Pour chaque type d'analyse, 8 animaux par condition seront nécessaires afin de pouvoir analyser les paramètres physiologiques (glycémie, stress oxydant) et fonctionnels (électrorétinographie et angiographie) par condition de régime alimentaire et par temps. Le nombre d'animaux qui sera utilisé dans le cadre de ce projet est justifié par la distribution a priori non normale des données et la différence attendue en termes de glycémie ($\Delta=60\text{mg/dL}$) entre les groupes. Du fait du nombre limité de répliques biologiques, un test non paramétrique sera utilisé.

Raffiner :

Chaque procédure sera réalisée en réduisant ou supprimant la douleur, en limitant la souffrance et le stress des animaux. A cette fin, des anesthésiques seront utilisés lors des électrorétinogrammes et imagerie rétinienne. L'unité dans laquelle le projet sera réalisé a mis en place une structure chargée du bien-être animal qui veillera et aidera les expérimentateurs à améliorer les conditions de réveils après anesthésie. Afin de réduire le stress des animaux, ils seront habitués à l'environnement avant le début de chaque expérimentation, à rester dans la pièce où ce dernier aura lieu.

5836. Dans le cadre de l'étude des relations hôtes-parasites, nous sommes amenés à nous intéresser aux protéines (de l'hôte et/ou du parasite), et en particulier à les localiser à l'échelle cellulaire, ou bien encore à purifier leurs partenaires d'interaction. Les anticorps sont des sondes spécifiques de choix, très largement exploitées dans la communauté scientifique, en particulier pour repérer les antigènes d'intérêt ou pour purifier des complexes protéiques. De très nombreux anticorps sont d'ailleurs disponibles commercialement. Cependant, comme aucun d'entre eux ne reconnaît les antigènes que nous étudions, nous sommes amenés à fabriquer nous-mêmes ces sondes. Ces anticorps sont synthétisés par l'animal vivant en réponse à l'injection des protéines d'intérêt et se retrouvent dans le sang à partir duquel ils sont extraits. Il n'existe actuellement aucune méthode substitutive aussi performante en termes de spécificité et d'affinité des sondes produites. L'objectif de ce projet est donc l'obtention d'anticorps polyclonaux spécifiques dirigés contre des protéines des modèles biologiques de l'équipe.

Les petites quantités d'anticorps dont nous avons besoin pour chaque protéine d'intérêt nous permettent de choisir une production d'anticorps chez la souris à raison d'un ou deux animaux par protéine ciblée. Nous envisageons la production de ~20 anticorps par an (soit 90 animaux sur la durée du projet). La procédure expérimentale d'injection sera effectuée sous anesthésie gazeuse légère en boîte à induction au moyen d'oxygène, d'air médical et d'isoflurane afin de minimiser le stress et l'inconfort des animaux au cours de la manipulation. L'injection pouvant éventuellement entraîner des lésions au site d'injection, les animaux seront surveillés quotidiennement.

5837. 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 ? En combinant des techniques de pointe – imagerie calcique en microscopie multiphotonique, enregistrements électrophysiologiques ciblés – chez des souris exprimant génétiquement un marqueur d'activité neuronale, nous visualiserons en temps réel la dynamique de l'activation de ce circuit et identifierons les neurones impliqués. Les résultats permettront le développement de thérapies spécifiques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant la visualisation de l'activité neuronale 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 utiliserons une préparation contenant un segment de peau lié à son nerf cutané relié à son segment de moelle correspondant. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal par injection d'une dose létale de pentobarbital est nécessaire pour réaliser la préparation *ex vivo*. Le nombre de souris par groupe (n=20) est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les traitements 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 et autour du territoire lésé.

Le nombre de souris expérimentales est de 60 (20 contrôles, 20 douleurs inflammatoires, 20 douleurs neuropathiques) Chaque préparation animale sera testée par 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 que la préparation *ex vivo* est viable et adéquate pour des enregistrements en imagerie calcique et électro physiologiques. Afin d'obtenir un nombre suffisant de souris, il sera nécessaire de mettre en place des couples reproducteurs (10 répartis en 5 couples de 2). Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc de 90 souris adultes. 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 proscrite. 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 (CFA ou CCI). 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.

5838. Les tests USP sont un ensemble de tests *in vivo* pour caractériser la biocompatibilité de base des polymères à usage médical. Ils doivent être réalisés sur des organismes vivants (remplacement) selon des conditions bien déterminées (nombre d'animaux, conditions de raffinement). Six classes de matières plastiques sont définies, fondées sur les réponses à une série de tests *in vivo* pour lesquels les extraits, les matériaux et les voies d'administration sont précisées. Ce projet utilise un total de 26 animaux (20 souris Swiss et 6 lapins Néozélandais).

Les trois tests *in vivo* suivant constituent l'ensemble des tests de classes USP <88>:

TEST DE TOXICITÉ SYSTÉMIQUE:

L'objectif est l'évaluation de la toxicité systémique, plutôt que l'évaluation d'une altération de cellules ou d'organes individuels. Dans les tests « aigus » de toxicité systémique, le matériau d'essai (extrait) est testé pour ses effets toxiques systémiques à la suite d'une seule exposition.

L'élément d'essai étant un solide qu'on ne peut pas administrer tel quel, des extraits sont préparés à partir de cet élément d'essai et ce sont ces extraits qui sont administrés chez l'animal (dans ce test, la souris). Les extraits du matériel d'essai sont préparés dans 4 milieux d'extraction différents: une solution saline, une solution au 1:20 Ethanol / Saline solution, du Polyéthylène Glycol 400 et de l'huile de coton. Ceci, de manière à couvrir l'ensemble de ce qui pourrait être relargué par l'élément d'essai (donc aussi bien des substances ayant une affinité pour les solvants polaires que des substances ayant une affinité pour des solvants apolaires).

Les extraits polaires (solution saline et 1:20 éthanol / solution saline) sont injectés chez les souris par voie intraveineuse et les extraits apolaires (Polyéthylène Glycol 400 et huile de coton) sont injectés par voie intrapéritonéale. Les animaux contrôle reçoivent seulement le véhicule d'extraction seul.

Au total 20 animaux sont utilisés: 5 par groupe x 4 groupes.

Le test est considéré comme négatif si aucun des animaux injectés avec le matériau d'essai ne montre une réaction biologique plus grande que les animaux traités avec la substance témoin négative.

TEST D'IRRITATION - injection intradermique:

L'objectif est l'évaluation de la capacité du matériel à provoquer une irritation sur la partie exposée du corps. Ce test d'irritation intradermique est effectué pour évaluer les réactions inflammatoires après l'application d'extraits de l'élément d'essai.

De la même manière que pour le test de toxicité systémique décrit précédemment, les extraits sont préparés dans 4 milieux d'extraction différents. Les extraits de l'élément d'essai et les véhicules d'extraction seuls (sites d'injection contrôles) sont injectés par voie intradermique chez les lapins.

Un total de 4 lapins est utilisé dans ce test.

Les sites d'administration sont observés sur une période de 72 heures. Un indice d'irritation primaire est déterminé en fonction des critères d'évaluation définis dans l'USP <88>.

TEST D'IMPLANTATION:

L'objectif est l'évaluation des effets pathologiques locaux sur les tissus vivants, à la fois macroscopique et au niveau microscopique d'un élément d'essai qui est implanté chirurgicalement dans un site d'implant approprié. L'implantation évalue les effets locaux des éléments d'essais implantés sur les tissus vivants.

Un total de 2 lapins est utilisé dans ce test.

L'élément d'essai et un contrôle approprié sont implantés pendant 7 jours dans le muscle paravertébral des lapins. A la fin de la période d'observation, la zone de tissu entourant la position centrale de chaque bande de l'implant sera examinée macroscopiquement. Pour les essais de classes USP, aucun examen histologique n'est nécessaire.

5839. La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par l'infection pulmonaire avec *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Malgré l'existence d'un vaccin (M. bovis-BCG) depuis 1921, cette maladie reste encore un problème majeur de santé publique avec 9 millions de morts en 2013 et 1/3 de la population mondiale chroniquement infecté. Le succès de Mtb à persister dans l'hôte après infection est le résultat de sa résistance aux antibiotiques et son évasion des mécanismes mis en place par le système immunitaire pour éliminer ce pathogène. Notre projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes défailants au cours de la réponse immunitaire antituberculeuse. Pour cela, nous utilisons un modèle murin préclinique de tuberculose, et différentes méthodologies (Cytométrie en flux, Microscopie confocale et biphotonique, protéomique et transcriptomique) qui, ensemble, nous permettront d'explorer la fonction de différents types cellulaires au cours de l'infection. En parallèle, nous étudierons la réponse immunitaire contre des composants purifiés de la paroi de Mtb, décrits comme étant des facteurs de virulence capable de moduler cette réponse, mais dont les mécanismes d'action restent encore peu connus. Notre objectif principal est d'identifier des potentielles cibles thérapeutiques pour renforcer le système immunitaire contre Mtb ainsi qu'évaluer l'efficacité de nouveaux protocoles vaccinaux à protéger contre l'infection. Le recours aux modèles murins et plus précisément à 8481 animaux pour nos études suivra une démarche éthique stricte qui consiste à :

1. Nous effectuerons les mises aux points nécessaires *in vitro* avant de procéder à des procédures chez l'animal et si nécessaire des mises au point *in vivo* sur des animaux excédentaires d'élevage de nos collègues n'ayant subi aucune autre procédure.
2. Utilisation d'une approche méthodologique qui élimine la majorité de la variabilité biologique et qui augmente notre sensibilité de détecter des différences entre les groupes expérimentaux (expériences répétées au moins 3 fois). Celle-ci combinée avec la quantification d'un nombre maximal de paramètres sur différents organes et l'utilisation de procédures non-invasives et longitudinales (ex. imagerie), permet de réduire le nombre total d'animaux utilisés dans notre projet.
3. Suivi quotidien des animaux (tous les jours) pour détecter précocement des altérations de l'état général des animaux et l'utilisation de l'anesthésie dans toutes nos procédures de façon à minimiser l'angoisse et la souffrance à chaque procédure.

5840. Les muqueuses pulmonaire et sexuelle sont les principales portes d'entrée des agents pathogènes. Une immunité spécifique localisée dans ces muqueuses est donc essentielle pour protéger efficacement contre les pathologies liées à ces micro-organismes. Or, les protocoles classiques de vaccination, qui ne ciblent pas spécifiquement les muqueuses, ne permettent pas de bloquer l'entrée des agents infectieux dans l'organisme. Les connaissances actuelles concernant l'immunité muqueuse montrent qu'une induction locale est nécessaire au développement d'une immunité protectrice. Cependant, elle ne peut être obtenue sans l'utilisation d'un adjuvant stimulant la réponse immune dans les muqueuses. Ce projet vise à confirmer expérimentalement la capacité de l'interleukine-7 à augmenter les réponses immunitaires muqueuses induites par l'administration locale d'antigènes.

Nos résultats préliminaires montrent que cette molécule, déjà utilisée en clinique chez l'homme pour d'autres applications et sans effet secondaire, serait un bon candidat comme adjuvant de vaccination muqueuse. En effet, administrée à la surface des muqueuses, cette molécule induit la production locale de différents facteurs permettant d'attirer les cellules immunitaires dans les sites à protéger, étape essentielle à l'initiation de la réponse immunitaire.

Nous proposons donc de tester le pouvoir adjuvant de l'interleukine-7 dans 2 modèles de vaccination muqueuse couramment utilisés en laboratoire: une vaccination pulmonaire contre le virus de la grippe et une vaccination vaginale contre le virus de l'herpès. La mise en place d'une réponse immune étant un processus complexe impliquant de nombreux types cellulaires et des échanges entre les muqueuses et les organes lymphoïdes, elle ne peut pas être récapitulée *in vitro*. Il est donc impératif d'utiliser des modèles animaux pour tester l'efficacité d'une vaccination.

Les expériences *in vitro* ayant été réalisées, nous définirons, sur un petit nombre de souris (180), les doses d'interleukine-7 et les cinétiques d'administration optimales pour induire les réponses immunitaires muqueuses aux deux sites de vaccination. Nous confirmerons ensuite la capacité des protocoles ainsi établis à induire une immunité protectrice contre le virus de la grippe et le virus Herpes. L'ensemble du projet sera réalisé sur une période de 5 années.

648 souris seront nécessaires au total (324 souris pour chacune des voies d'immunisation -pulmonaire et vaginale-). Toutes les manipulations de souris seront réalisées sous anesthésie générale, en apportant une attention particulière au réveil des animaux.

Seuls des prélèvements non invasifs seront réalisés, sous anesthésie. En fin de protocole, les souris seront euthanasiées par anesthésie terminale pour l'étude *in situ* des caractéristiques des réponses immunes induites.

Dans son ensemble, ce projet permettra :

- De confirmer le pouvoir adjuvant de l'interleukine-7 pour induire une immunité protectrice contre les infections par voie muqueuse

- De développer des méthodes d'immunisation non invasives à la fois contre les infections des voies respiratoires et les infections sexuellement transmissibles

- D'apporter des avancées significatives sur la compréhension des réponses immunologiques pulmonaires et vaginales encore incomplètement décrites.

A terme, ce projet permettra de proposer des protocoles non invasifs d'immunisation contre les pathogènes spécifiques des muqueuses utilisables facilement dans les populations humaines.

5841. Notre étude est centrée sur l'ostéosarcome (OS), la plus fréquente des tumeurs osseuses malignes primitives, à l'origine de la principale cause de décès par cancer chez les enfants et les adolescents. Ces tumeurs osseuses envahissent facilement d'autres tissus pour donner des métastases, fréquemment dans les poumons. Lors du diagnostic d'OS, les métastases pulmonaires sont déjà présentes chez plus de 20% des patients. Les métastases signent la gravité de maladie. En effet, les patients présentant un OS métastatique ou récidivant répondent mal aux traitements actuels et le taux de guérison, chez ces patients, reste très bas et inchangés depuis 30 ans. Il est par conséquent essentiel de développer de nouveaux traitements efficaces pour toutes ces situations d'impasse thérapeutique.

Les globules blancs (GBs) représentent des acteurs clés de la réponse immunitaire anti-tumorale sachant que ces cellules sont capables de reconnaître/détruire les cellules cancéreuses. Dans de nombreux cancers, les GBs sont faiblement représentés et/ou inactifs. Les chimiokines sont des molécules normalement produites par l'organisme permettant aux GBs de patrouiller dans les tissus et de jouer un rôle de sentinelle. Dans de nombreux cancers, la production de chimiokines est altérée expliquant en partie, la faiblesse du système immunitaire à reconnaître/détruire les cellules cancéreuses. Par ailleurs, l'activation des GBs est régulée par un ensemble de signaux co-activateurs et de signaux co-inhibiteurs appelés checkpoints immunologiques. Des découvertes récentes en cancérologie ont révélé que les cellules cancéreuses étaient capables de manipuler le système immunitaire au niveau des checkpoints dans le but de paralyser les GBs. De nouveaux traitements anticancéreux ont été développés pour cibler ces checkpoints et ont donné des résultats spectaculaires en termes de régression des tumeurs notamment dans le mélanome métastatique.

Notre projet qui nécessitera un total de 1344 souris a pour objectif d'évaluer dans des modèles précliniques murins d'ostéosarcome (tumeur primaire et métastases pulmonaires) les effets de traitements associant deux stratégies anticancéreuses complémentaires, l'une visant à favoriser, à l'aide d'une chimiokine, un recrutement sélectif de GBs dans la tumeur, l'autre visant à neutraliser les checkpoints immunitaires à l'aide d'anticorps spécifiques.

D'un point de vue expérimental, nous nous proposons d'utiliser la lignée murine d'ostéosarcome K7M2 injectée dans le fémur (modèle de tumeur primaire récidivante) ou dans la veine caudale (modèle de métastases pulmonaires expérimentales) de souris syngéniques Balb/c.

En termes de remplacement, Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives *in vitro* permettant de reproduire l'environnement immunitaire d'une tumeur. De plus, l'environnement immunitaire d'une tumeur ostéosarcomateuse se développant dans l'os versus dans les poumons étant différent, nous oblige de fait à développer les 2 modèles précliniques (tumeur primaire versus métastases).

En termes 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 sont manipulés le plus paisiblement possible et hébergés dans des cages enrichies avec un igloo et des tiges/carrés de coton afin de limiter au maximum leur stress. Les animaux sont visités régulièrement afin 1-de détecter tous signes de souffrance/inconfort et 2- de mettre en place des traitements/solutions adaptés aux problèmes identifiés

5842. Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Il s'agit ici d'un renouvellement d'autorisation. La règle des 3R (réduire, remplacer et raffiner) est ainsi mise en œuvre dans toutes les études. L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie et pharmacologie chez le mini-porc pour un produit donné en vue d'une administration unique ou répétée, en accord avec la réglementation qui impose des tests précliniques sur l'animal avant le passage à l'Homme pour les essais cliniques. Le choix du mini-porc se justifie par la nécessité d'une forte analogie entre l'animal et l'Homme et en prenant en compte les données scientifiques disponibles. Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études réglementaires de ce type. Ce nombre est estimé à 1800 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Le mini-porc dispose d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de son environnement ainsi que des récompenses. Les études précliniques consistent en l'administration de substances pouvant provoquer un effet pharmacologique ou toxique, et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Le raffinement sera appliqué à toutes les phases des procédures en conformité avec les recommandations internationales publiées concernant le bien-être animal : nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux, nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité, nous procurerons un environnement enrichi et une socialisation des animaux en groupes en ce qui concerne les femelles. Les techniques pouvant engendrer du stress, comme un isolement temporaire, seront limitées au minimum, et la douleur sera traitée avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante. Une démarche qualité rigoureuse, une supervision de chaque lot d'étude par le directeur d'étude concerné, ainsi que des bilans réguliers impliquant les techniciens, permettront d'appliquer toute alternative respectueuse du bien-être animal. Les mini-porcs sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises par le vétérinaire et/ou le directeur d'étude pour maximiser le bien-être des animaux. Ces études sont réalisées dans un objectif de progrès scientifique ou biomédical avec des conséquences positives sur l'Homme ou l'animal pour les produits vétérinaires. Elles permettent un gain potentiel en terme de brevet ou d'acquisition de compétences et connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisés, c'est pourquoi l'intervention des Vétérinaires, du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) est indispensable afin de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

5843. La cystinose est une maladie génétique rare affectant environ 1 naissance sur 100'000 dans le monde. Dans sa forme néphropathique infantile, les patients développent un dysfonctionnement sévère du tubule proximal du néphron appelé syndrome de Fanconi dès l'âge de 6 mois et atteignent une insuffisance rénale sévère vers l'âge de 10 ans. D'autres mutations causent deux autres formes moins invalidantes de cystinose, la forme juvénile et la forme oculaire.

Le seul traitement existant actuellement permet de retarder la progression des symptômes sans toutefois soigner la maladie. Les connaissances actuelles indiquent qu'une voie de signalisation cellulaire importante dans la gestion de la balance énergétique est impliquée dans la pathologie de la cystinose néphropathique et offrent donc des perspectives scientifiques tant au niveau fondamental que clinique.

Notre projet a pour but de définir le rôle de la balance entre dépense et économie d'énergie par les reins dans la pathologie de la cystinose. Seule l'utilisation d'un modèle mammifère suivant un processus complet de développement de la pathologie permet de s'approcher au plus près de la maladie humaine. La reproduction des symptômes de la maladie étant actuellement bien décrite dans le modèle de souris transgéniques que nous utilisons, nous réduisons la souffrance en menant nos recherches sur de jeunes animaux de 14 semaines n'ayant pas encore développé d'atteinte rénale apparaissant à partir de 6 mois. Les animaux seront soumis à trois injections de rapamycine par voie intrapéritonéale. Cette drogue également utilisée en médecine humaine permet de réduire la dépense énergétique par les cellules de l'organisme. Nos expériences se focaliseront sur les effets de la rapamycine sur les cellules du rein. Nous testerons aussi la capacité des cellules rénales de ce modèle animal de cystinose à adapter leur métabolisme correctement à l'arrivée d'acides aminés dans la circulation sanguine que nous administrerons oralement. Nous prévoyons également de prélever du sang (7-10% du volume circulant) pour mesurer les concentrations de différentes hormones et substances impliquées dans le métabolisme énergétique des cellules rénales atteintes par la maladie (insuline, glucagon, acides gras entre autres). Comme la transition entre alimentation placentaire et tétée est critique dans la balance entre dépense et économie d'énergie, nous sommes également amenés à travailler sur des animaux nouveau-nés afin de caractériser les aspects les plus précoces de la pathologie.

Nous ne disposons pas à ce jour d'études publiées suffisamment similaires sur lesquelles nous baser afin effectuer le minimum d'expériences possible dans le respect de la règle des 3R. Nous développons également en parallèle des modèles cellulaires de substitution *in vitro*. Ces cellules sont isolées à partir d'embryons et nous permettront à terme de poursuivre nos investigations fonctionnelles *in vitro* en réduisant considérablement le nombre d'animaux utilisés.

Nous incluons des études pilotes réalisées sur des souris excédentaires afin de définir précisément les conditions auxquelles les animaux expérimentaux seront soumis. Nos effectifs sont prévus pour s'affranchir de la variabilité possible et seront revus à la baisse si les premières séries d'expériences indiquent une faible variabilité. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux.

Un total de 1175 souris seront nécessaires à différents stades de développement allant de l'embryon à l'animal adulte seront utilisés dans cette étude qui devrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cette pathologie.

5844. Le choc septique est le stade le plus grave d'une infection. Il constitue un motif fréquent d'admission en réanimation et il est responsable chaque année de nombreux décès (40%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre la physiopathologie du choc septique, afin de trouver de nouveaux marqueurs diagnostiques et de nouveaux traitements. Une des principales caractéristiques du choc septique est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. On sait par exemple que les globules blancs, en particulier les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle central dans cette réaction inflammatoire. En revanche, les polynucléaires joueraient également un rôle dans l'activation de la coagulation, en interaction probablement avec l'endothélial qui revêt la face interne des vaisseaux, et avec les plaquettes. Les plaquettes sont connues pour leur rôle clé dans l'hémostase, qui permet l'arrêt des saignements.

Dans le choc septique, des données récentes de la littérature indiquent que les plaquettes pourraient avoir tantôt des effets délétères en augmentant l'inflammation, tantôt des effets bénéfiques par leurs propriétés anti-infectieuses.

Notre projet vise donc à mieux comprendre les interactions entre les cellules impliquées dans la défense anti-infectieuses et l'installation du choc septique, notamment les interactions entre les leucocytes, les plaquettes, et l'endothélium. L'objectif est *in fine* d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces et plus précoces. Notre projet sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Remplacer : Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les effets d'un choc septique sur l'ensemble de l'organisme sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Cependant, l'identification préalable des mécanismes moléculaires probablement impliqués ont été faits à l'aide de méthode alternative (modèle de cultures cellulaires stimulées par une endotoxine).

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (t-test, one way ou two-way ANOVA selon les expériences). Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal. L'ensemble de ces expériences nécessitera au maximum 210 souris. Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- toutes les expériences seront réalisées sur des animaux anesthésiés
- les animaux sont alors replacés dans leur cage d'origine avec des congénères qui ont subi la même opération. Un gel nutritif est présent dans la cage ainsi que la nourriture standard déposée au fond pour faciliter la prise de nutriments et l'hydratation, ainsi que du coton cardé pour permettre aux animaux de se maintenir au chaud.
- des traitements antalgiques seront administrés
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état
- les expériences sur animaux vigiles auront une durée limitée dans le temps
- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort et différents tissus seront prélevés.

5845. Objectifs : L'objectif du projet est de décrire l'utilisation de l'espace pendant la reproduction par les saumons de l'Atlantique qui matures sexuellement lors de leur deuxième année en rivière, dits tacons maturants précoces. Plusieurs études ont quantifié la contribution de ces tacons précoces dans la reproduction des populations naturelles. Par ailleurs, d'autres études ont décrit les déplacements des individus anadromes (qui se reproduisent après leur migration océanique) et leur impact sur leur succès reproducteur. Les mâles anadromes se déplaçant beaucoup rencontraient beaucoup de femelles mais ce sont ceux qui établissaient leur domaine vital près des radiers les plus profitables au développement des alevins qui acquéraient le plus de partenaires et produisaient le plus de descendants. Cependant, les stratégies spatiales de tacons précoces sont encore inconnues : établissent-ils à l'avance un territoire sur une zone probable de frai ? Circulent-ils entre les frayères ? Sur quels indices environnementaux basent-ils leurs déplacements ? Etant donné leur contribution significative à la reproduction, les réponses à ces questions éclaireront l'analyse de la structuration génétique des populations de saumon. L'objectif de l'étude envisagée ici est de documenter les déplacements des tacons précoces pendant la saison de reproduction, et de lier leur utilisation de l'espace à des caractéristiques environnementales et à la probabilité de rencontre avec les femelles actives. Cet objectif sera poursuivi en suivant 20 tacons précoces âgés de 1 an par radiopistage dans la rivière pendant la saison de reproduction, de novembre à janvier. Parallèlement 20 tacons non maturants seront également suivi comme témoins, pour tester l'hypothèse selon laquelle la mobilité et les préférences d'habitat sont influencés par la maturité sexuelle. De plus, l'habitat et les frayères seront cartographiés afin de déterminer respectivement les variables environnementales influençant les déplacements et les conséquences de ces déplacements sur la probabilité de rencontrer des femelles actives sexuellement.

Les 40 individus seront prélevés par pêche à l'électricité, anesthésiés, puis après quelques mesures biométriques (photo, longueur, poids, vérification du statut de maturation par échographie), marqués avec des émetteurs radio fixés en externe sous leur nageoire dorsale. Lors de cette opération chirurgicale, les fils d'attache de l'émetteur sont insérés entre les os soutenant la nageoire dorsale grâce à des aiguilles de seringue servant de trocart puis bloqués sur le flanc opposé du poisson grâce à des œilletons en PVC. Un dommage possible lié à ce type de marquage est l'abrasion du tégument au contact de l'émetteur. Dans le pire des cas, ceci peut favoriser l'infection par des bactéries ou des champignons. Pour limiter ce risque, les aiguilles seront stériles et tout le matériel de marquage, ainsi que les émetteurs seront nettoyés à la Bétadine. Une fois marqués, les poissons se réveilleront dans un bac prévu à cet effet et disposé sur le site de capture. Ils seront ensuite radiopistés quotidiennement jusqu'au mois de janvier. Ils seront alors recapturés par pêche électrique, à nouveau anesthésiés, mesurés et pesés, et débarrassés de leur émetteur radio. Pour ce faire, les fils d'attache seront coupés aux ciseaux (désinfectés). Tous les poissons seront ensuite relâchés sur leur site de capture, après inspection de l'état sanitaire.

Travaillant sur le comportement reproducteur des saumons sauvages en milieu naturel, 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 décrire la variabilité du comportement en milieu naturel, donc un effectif de 20 par statut de maturation nous semble approprié. Concernant le raffinement, les poissons ne passeront que quelques minutes hors de leur milieu naturel pendant les 3 mois de l'expérience, et ce sous anesthésie.

5846. Afin de pouvoir évaluer l'impact de l'introduction de nouvelles sources protéiques en alimentation humaine, il faut être capable d'évaluer la qualité des protéines. Pour ce faire, la FAO (Food and Agriculture Organization) recommande de déterminer la biodisponibilité des acides aminés constitutifs des protéines d'intérêt *in vivo*. Cette étude a pour objectif de déterminer la

biodisponibilité en acides aminés du colza et du tournesol, qui représentent un « gisement » important de protéines en France et en Europe, grâce à une méthodologie peu invasive, préalablement à la réalisation d'une étude clinique. Les résultats seront comparés à ceux de la spiruline, autre source de protéines d'intérêt pour l'alimentation humaine. Nous utiliserons des protéines de tournesol préalablement marquées avec deux isotopes stables, le 15N et le 2H, ainsi que de la spiruline marquée au 13C et au 15N. Ces isotopes stables sont sans danger (ils n'émettent pas de rayonnement) et peuvent être suivis dans l'organisme de l'animal, notamment au niveau sanguin.

Deux groupes de 8 rats ingéreront des protéines de tournesol marquées, incorporées à un repas test. Des prises de sang seront effectuées avant et après le repas. Un groupe de 8 rats sera euthanasié 4 h après le repas, le second groupe de 8 rats sera euthanasié 6 h après le repas. Un autre groupe de 8 rats ingérera un repas à base de spiruline marquée et sera euthanasié 6 h après le repas. Les contenus digestifs ainsi que le plasma seront collectés. L'apparition des isotopes stables issus des protéines ingérées dans le sang sera analysée et comparée à celle obtenue dans les contenus digestifs. Nous pourrions ainsi conclure sur la validité de ce marqueur sanguin comme critère de biodisponibilité des acides aminés alimentaires.

Les méthodes de digestion *in vitro* ne permettent pas en l'état actuel des connaissances d'obtenir de données représentatives de la biodisponibilité *in vivo* des acides aminés alimentaires. Ces mesures ne peuvent être réalisées que chez l'animal et chez l'Homme. Cette étude pilote, de taille limitée, est nécessaire pour définir les conditions d'expérimentation qui seront applicables chez l'Homme.

L'étude est réalisée sur un nombre restreint d'animaux (24 au total). Le nombre de 8 rats par groupe est un nombre minimum compte tenu des variations interindividuelles des signatures isotopiques dans les contenus intestinaux et le sang. Les animaux sont hébergés et manipulés dans des conditions qui n'engendrent pas de stress. Le protocole expérimental ne génère pas de souffrance: les prises de sang sont réalisées à la veine de la queue, et le volume de sang prélevé est limité.

Les animaux seront manipulés par les expérimentateurs tous les jours afin de minimiser le stress, (lors des pesées) et les cages individuelles seront enrichies avec des tunnels. Les animaux ne pourront pas être placés en cages collectives car ce type d'hébergement n'est pas compatible avec le contrôle d'une prise alimentaire calibrée. La qualification des expérimentateurs permet d'éviter toute douleur lors des manipulations liées à l'entretien des animaux et à leur suivi (ex : pesée).

5847. Certains sportifs suivent de près les avancées dans le domaine médical et cherchent à utiliser de nouveaux médicaments dans le but d'augmenter leurs performances sportives. Pour échapper aux contrôles anti-dopage, ils se tournent vers des molécules non autorisées, encore au stade du développement clinique, qu'ils arrivent à se procurer au marché noir et ceci en dépit des risques pour leur santé (absence d'informations sur la pureté des produits ou leurs effets secondaires). Une nouvelle génération d'anti-anémiques, des stabilisateurs du facteur inductible par l'hypoxie (HIF), est en cours de développement et comporte de nombreuses molécules. Ils vont induire l'expression de gènes facilitant le transport de l'oxygène comme le gène de l'EPO (érythropoïétine) qui stimule la production de globules rouges. Les laboratoires anti-dopage ont besoin de tests pour pouvoir détecter l'utilisation de ces nouveaux produits et ainsi dissuader les sportifs de les utiliser. Plutôt que de rechercher chaque nouvelle molécule une par une, la possibilité de rechercher des biomarqueurs (molécules induites par l'action du médicament) est une alternative intéressante car ils peuvent être retrouvés même après l'élimination du produit utilisé et sont modifiés de la même façon par toutes les molécules ayant une même action sur l'organisme (comme dans ce cas la stabilisation du facteur HIF). Depuis quelques années, les petits ARNs circulants (les microARNs) sont considérés comme de bons biomarqueurs potentiels et peuvent être dosés dans le plasma.

Le but de ce projet est donc de tester l'effet de deux stabilisateurs d'HIF différents (FG-4592 et BAY85-3934) sur l'expression de l'EPO et des microARNs circulants dans le plasma de rats, par rapport à des rats ayant reçu un placebo et à des rats placés dans un environnement hypoxique (un phénomène reproduisant l'effet de l'altitude, la diminution en oxygène stabilisant naturellement le facteur HIF). Au total le projet comportera 24 rats.

Nous espérons identifier une signature spécifique de l'utilisation des stabilisateurs d'HIF dans le plasma, qui puisse être transposée à l'homme pour constituer un nouveau test de détection de ces molécules pour la lutte anti-dopage.

Ces phénomènes ne peuvent être étudiés *in vitro* et nécessitent l'utilisation d'organismes dans leur intégralité. Le nombre de rats par groupe a fait l'objet d'une étude statistique minutieuse, ce qui a permis de déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les expérimentations (prélèvements de sang) seront réalisées sous anesthésie.

5848. Le syndrome d'Ondine est une maladie génétique rare, constatée dès la naissance : le nouveau-né diminue jusqu'à arrêter de respirer pendant le sommeil. Une caractéristique majeure est l'absence d'un réflexe respiratoire important : l'augmentation de la respiration lorsque l'on inhale du CO₂ (sensibilité à l'hypercapnie). La maladie est provoquée par une mutation hétérozygote du gène PHOX2B. Ce gène est déterminant dans le développement embryonnaire du système nerveux autonome qui contrôle les grandes fonctions vitales comme la respiration. La mutation est généralement de type expansion d'alanine au sein d'un lot de 20 alanines, la forme majoritaire est une expansion de 7 alanines supplémentaires. Actuellement, il n'existe aucun traitement pharmacologique et le recours à une ventilation mécanique à vie pendant le sommeil est nécessaire. Une forme particulière, désignée "late-onset" caractérise les patients dont le diagnostic est tardif pendant l'enfance ou plus rarement à l'âge adulte. La maladie se déclare à l'occasion d'une anesthésie générale, ou plus rarement d'une infection pulmonaire. La longueur de l'expansion est plus faible (+4 ou +5 alanines). Les mécanismes de déclenchement tardif de la maladie ne sont pas connus.

Nous disposons de deux souris génétiquement modifiées : souris portant la mutation majoritaire de 7 alanines supplémentaires (mutation constitutive Phox2b27Ala/+;PGKCre/+ notée souris KI) et une souris dont la même mutation a été restreinte dans le noyau rétrotrapézoïde (RTN) situé dans le tronc cérébral (mutation tissu spécifique Phox2b27Ala/+ ; Krox20Cre/+ notée souris

CKI). Ces souris naissent sans sensibilité au CO₂ et sans le RTN, une structure importante pour cette sensibilité. Les souris KI meurent dans les heures qui suivent la naissance tandis que les souris CKI survivent et récupèrent partiellement une sensibilité au CO₂ de l'ordre de 40% des souris sauvages à l'âge adulte. Des études *in vitro* sur des cellules humaines transfectées ont montré que la mutation polyalanine provoque des agrégats protéiques et perturbe l'activité transcriptionnelle de PHOX2B sur ses gènes cibles.

Les souris CKI permettent de comprendre la récupération fonctionnelle de la sensibilité au CO₂, de trouver les traitements qui stimulent cette récupération, de caractériser l'origine du dysfonctionnement respiratoire et mieux définir les cibles thérapeutiques chez les patients "late-onset".

Nous testerons sur les souris KI l'efficacité de la ventilation mécanique. L'allongement de la survie des mutants permettrait la mise en place de traitements notamment l'administration de traitement par aérosol ce qui permet de s'affranchir des injections.

Nous testerons les molécules suivantes : les molécules anti-agrégats ayant un rôle dans la conformation des protéines (les dérivées de la geldanamycine, la curcumine, le tréhalose, la progestérone et ses dérivées) et la kétamine.

Le 17-DMAG est utilisé en lieu et place du 17-AAG, dérivé de la geldanamycine, en raison de son hydrophobicité (demande d'autorisation déposée au ministère comportant des procédures utilisant le 17-AAG).

La kétamine (antagoniste du récepteur NMDA au glutamate) induit une baisse d'expression du gène Phox2b chez le poisson zèbre et compromet la capacité d'auto-ressuscitation en situation d'anoxie. L'exposition à la kétamine (antagoniste du récepteur NMDA au glutamate) chez les souris CKI peut entraîner une forte dépression respiratoire et ce quel que soit le stade. Ces souris permettront de caractériser sur le plan fonctionnel l'origine du dysfonctionnement respiratoire des patients late-onset.

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. L'approche *in vivo* permet de voir les effets de la mutation dans un contexte physiologique. De plus, pour les médicaments à visée pédiatrique, l'agence européenne du médicament recommande des tests sur des rongeurs juvéniles. Ceci pour garantir la bonne qualité et l'efficacité du produit sur la population cible.

L'étude s'étale sur 5 ans et prévoit d'utiliser 1880 souris dont 280 souris adultes (reproducteurs et souris adoptantes) pour l'ensemble des 16 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour permettre la réduction des animaux utilisés et le raffinement dans les tests utilisés tout en assurant une puissance statistique élevée dans les tests effectués. Plusieurs paramètres sont mesurés de manière simultanée, dans des conditions non invasives (sans contention et sans sédation) et en thermoneutralité. Pour toutes les mesures, l'isolement du souriceau de la mère n'excède pas une heure. Des points limites sont établis aussi bien pour les reproducteurs que les souris des procédures expérimentales 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. Dans ce cas, la mise à mort est précédée par une anesthésie légère à la kétamine.

5849. Les pathologies impliquant les mitochondries (fournisseurs de l'énergie cellulaire à travers la chaîne respiratoire) sont fréquentes et sévères ; elles possèdent une prévalence de 1 personne sur 4300. La dysfonction de l'organite affecte le système nerveux central, le muscle, le cœur, le pancréas, le foie, le rein et les organes sensoriels. Les interventions thérapeutiques sont peu nombreuses et inefficaces entraînant l'évolution inexorable des symptômes et une morbidité élevée. Depuis une dizaine d'années l'implication de la mitochondrie dans les troubles neurodéveloppementaux est étudiée dans le cadre du syndrome autistique, la schizophrénie et les troubles bipolaires.

Le projet de recherche que nous développerons consiste à utiliser les souris Harlequin, comme modèle d'une pathologie mitochondriale afin de comparer les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de leur cervelet avec celles des souris knock-out (KO) *Fmr1*, modèle du syndrome de l'X fragile. Notre objectif est double : (1) établir si les anomalies du cervelet chez la souris Harlequin entraînent des troubles cognitifs ; (2) rechercher une corrélation entre les troubles cognitifs de la souris *Fmr1* et des perturbations dans le fonctionnement des neurones du cervelet. Ainsi, nous mettrons en place une thérapie génique pour permettre l'expression du gène codant la protéine mitochondriale Neuroglobine NGB via l'administration des vecteurs AAV2 car nous avons précédemment montré que cette protéine est capable de protéger de façon pérenne la fonction mitochondriale empêchant ainsi la mort neuronale dans des situations pathologiques.

Nous utiliserons au total 440 souris soit 220 par lignée ; la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement) a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée de manière continue : 1) remplacement, bien que les études *in vitro* à partir des neurones du cervelet ne permettent pas l'examen de fonctions cognitives et motrices complexes, 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.

2) réduction, nous utiliserons le moins de souris possibles tout en veillant à obtenir des données statistiques significatives ; 3) 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 (acclimatation, soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité de locaux d'expérimentation) ; *in vitro*

5850. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 1ère cause de handicap acquis et la 3ème cause de mortalité dans les pays industrialisés. L'AVC ischémique (80% des AVC) est dû à l'occlusion d'une artère cérébrale. Il induit non seulement une perte neuronale mais aussi des lésions vasculaires qui peuvent conduire à des hémorragies intracérébrales (encore appelées

transformations hémorragiques) qui aggravent le déficit neurologique. Le rt-PA (activateur tissulaire du plasminogène recombinant), un thrombolytique qui a pour but de lyser le caillot afin de rétablir la circulation dans l'artère occluse, est le seul traitement actuellement disponible pour les AVC ischémiques. Cependant, le rt-PA augmente le risque de transformations hémorragiques.

Ces données montrent l'urgence de développer, en plus des stratégies neuroprotectrices, des stratégies vasculoprotectrices visant à limiter les transformations hémorragiques chez les patients, traités ou non par le rt-PA.

La physiopathologie de l'AVC ischémique met en jeu de multiples mécanismes dont le stress oxydant. Ce dernier est toxique non seulement sur le plan neuronal mais aussi sur le plan vasculaire contribuant ainsi à la survenue des transformations hémorragiques. L'objectif du projet est d'évaluer le stress oxydant et les transformations hémorragiques spontanées ou induites par le rt-PA, dans deux modèles murins d'ischémie cérébrale afin de déterminer celui qui sera mis en œuvre pour examiner le potentiel thérapeutique de composés antioxydants innovants.

Une partie du programme de recherche est réalisée *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales cérébrales pour étudier la capacité anti-oxydante des composés. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'ischémie cérébrale mettent en jeu plusieurs types cellulaires, tant au niveau cérébral que périphérique. Il est donc indispensable d'associer à nos études *in vitro* des études chez l'animal vivant soumis à un modèle qui reproduit les AVC en clinique, et traité ou non par le rt-PA.

Les études seront réalisées sur des souris (142 souris au total). Ces souris seront anesthésiées puis soumises à une ischémie cérébrale, et traitées par le rt-PA ou par son solvant. Afin de prévenir toute douleur qui pourrait être associée aux modèles, les animaux seront traités par un antalgique deux fois par jour.

5851. Le présent projet est un enseignement pratique (TP) de Physiologie Animale qui vient en complément d'un enseignement théorique d'écophysiologie animale dispensé aux étudiants en 2ème année de master, futurs doctorants pour certains. L'objectif de cette unité d'enseignement d'écophysiologie animale est de donner aux étudiants des bases scientifiques et méthodologiques étendues et variées leur permettant d'étudier et de comprendre à la fois les mécanismes d'adaptation des organismes vivants au sein de leur environnement ainsi que leurs réponses adaptatives pour faire face aux variations naturelles et anthropiques de cet environnement. Sous nos latitudes, ces variations se manifestent notamment par l'alternance des saisons caractérisées par une variation de la durée de la phase lumineuse sur 24h ou photopériode (jours courts en hiver et longs en été) et de la température ambiante (froide en hiver et chaude en été). Ce TP qui vise à analyser comment l'organisme s'adapte à la mauvaise saison (jours courts et température ambiante basse) répond aux deux objectifs de la formation puisque l'étudiant est confronté (1) à la démarche scientifique, à l'acquisition de données, à leur traitement statistique et à la rédaction d'un rapport de TP sous forme d'un article scientifique et (2) à la diversité et à la complémentarité des approches méthodologiques qu'il aura à mettre en œuvre ou observer, couplant tout au long du TP approches de physiologie intégrée (suivi de la température corporelle), de biochimie (mesure des volumes d'O₂ consommée et de CO₂ rejeté) et de biologie moléculaire (amplification de gène). Le modèle animal utilisé pour le TP est le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) car c'est une espèce qui présente des variations saisonnières marquées de la plupart de ces fonctions physiologiques (métabolisme, fonction de reproduction, température corporelle, expression génique). Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3 "R".

Remplacer : Il n'est à l'heure actuelle pas possible de remplacer le modèle animal car l'intégration des paramètres environnementaux par l'animal requiert un réseau de structures centrales et périphériques complexe qui ne peut-être modélisé *in vitro* ou par un logiciel. Réduire : Néanmoins le nombre d'animaux a été réduit au minimum requis pour établir une significativité statistique à n=8/groupe expérimental soit 24 hamsters / an pour un total de 120 hamsters sur 5 ans. L'approche longitudinale a été également privilégiée puisque pour chaque animal la plupart des paramètres sont mesurés de façon répétée ce qui contribue également à réduire le nombre d'animaux utilisés. L'approche statistique utilisée repose sur des tests de comparaisons de moyenne et un ANOVA mesures répétées. Raffiner : Ce TP ne contient qu'une seule procédure invasive qui consiste à implanter dans la cavité abdominale de l'animal un enregistreur de température corporelle. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale avec mise en place des traitements analgésiques appropriés en péri- et post-opératoire. Pendant toute la durée du TP, les animaux seront hébergés en cage individuelle enrichie (bâton + frisure pour nid) afin d'assurer un suivi précis de la masse corporelle de chacun des animaux mais les cages étant ouvertes, chaque animal garde un contact olfactif et visuel avec ses congénères (cages ouvertes).

5852. La sclérose en plaques est une maladie du système nerveux central (SNC) dont les causes sont encore inconnues, même si plusieurs hypothèses sont actuellement proposées (implication du système immunitaire dans la destruction de la myéline, prédispositions génétiques, facteurs environnementaux, etc.). Cette maladie présente une physiopathologie complexe, caractérisée par une inflammation du système nerveux central, une démyélinisation et des lésions axonales.

Nous avons mis en évidence récemment chez la souris, une expression anormale du récepteur neuronal Plexine A1 dans les phases aiguës de démyélinisation induite par une exposition à la cuprizone (molécule séquestrant le cuivre). En parallèle, nous avons également développé au laboratoire un nouveau peptide thérapeutique anti-Plexine A1 (ou MTP-Plexine A1).

Nous souhaitons maintenant évaluer le potentiel thérapeutique ce nouveau peptide, dans un modèle préclinique de la sclérose en plaques. Le modèle d'induction à la cuprizone chez la souris a été retenu pour cette étude, car il mime parfaitement les lésions rencontrées dans ce type de pathologie.

Une caractérisation et une sélection *in vitro* du meilleur peptide anti-Plexine A1 seront effectuées au préalable. Le schéma expérimental le plus adapté sera ensuite sélectionné, et 2 concentrations de peptides seront utilisées pour déterminer la dose optimale d'efficacité du composé. Si ces résultats sont concluants, 5 nouveaux peptides (au maximum) dérivés du peptide MTP-

Plexine A1 seront testés. Ces dérivés posséderont diverses modifications chimiques (pégylation, alkylation, etc.) ou des modifications dans la séquence initiale du peptide, qui pourront conduire à de nouvelles fonctions par rapport au peptide d'origine. De ce fait, un nombre total de 600 souris sera nécessaire pour la totalité de cette étude, en cas de succès.

L'ensemble de cette étude nous permettra d'évaluer le potentiel préventif, mais aussi curatif du peptide MTP-Plexine A1 et de ces dérivés, en utilisant un minimum d'animaux. Des expériences de bio-distribution et des analyses de toxicité seront également effectuées pour démontrer à la fois la faisabilité ainsi que la sécurité du traitement *in vivo* avec ces peptides thérapeutiques.

Les lésions de la myéline seront suivies par IRM de diffusion pour une évaluation non-invasive optimale de la récupération de chaque animal, de façon individuelle.

In fine, l'objectif de ce projet est de démontrer que des peptides thérapeutiques optimisés et ciblant le domaine transmembranaire de récepteurs membranaires, peuvent être utilisés pour traiter des maladies du système nerveux.

Remplacement:

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

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisamment pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente.

Raffiner:

Les animaux sont vérifiés tous les jours et des points limites ont notamment été établis pour éviter toute souffrance. Les souris sont maintenues en groupe de 3 minimum par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels en plastique rouge pour favoriser l'activité. Les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau filtrée.

Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs une injection d'un analgésique sera effectuée une fois par jour jusqu'à disparition des symptômes.

5853. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) constituent une famille de protéines majeures présentes à la surface de l'ensemble des cellules de l'organisme. Ces protéines sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques et de pathologies associées (cancers, maladies neurologiques, maladies cardiovasculaires, obésité, douleur...) et représentent la cible de plus de 40% des médicaments commercialisés.

L'étude du fonctionnement de ces protéines souffre cependant du manque réel d'anticorps permettant de les cibler de manière efficace et spécifique dans des approches d'analyse, de diagnostique ou dans un but thérapeutique. Cette situation résulte d'un gap technologique important qui dépend de la nature même des RCPG et de leurs propriétés physicochimiques particulières qui compliquent l'obtention de ces anticorps par les méthodes habituelles.

Ce projet vise à évaluer une méthodologie alternative à ces approches en inoculant à des souris des particules virales non-réplicatives de type SFV (Semliki Forest Virus) exprimant une dizaine de RCPG humains d'intérêt thérapeutique. Remplacement : des tests réalisés sur des cellules en culture avec ce système bien caractérisé, montrent que les RCPG se retrouvent correctement repliés à la surface des cellules infectées de l'animal ce qui devrait promouvoir une réponse immunitaire conduisant à la génération d'anticorps particulièrement spécifiques et sélectifs.

Réduction : ce projet devrait nécessiter une centaine de souris, soit une dizaine d'animaux par RCPG étudié. Réduction : afin de réduire au maximum ce nombre d'animaux, nous prévoyons de réaliser une étude pilote sur 2 RCPG modèles. Cette étude préliminaire devrait ainsi permettre d'affiner les conditions d'immunisation et idéalement de diminuer le nombre d'animaux à 3 souris par récepteur. Nous pensons utiliser un total de 96 animaux. Raffinement : afin de raffiner aux mieux notre méthodologie le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi, si besoin un analgésique dont la durée d'action s'étend au-delà de 24h est utilisé, des points limites que sont l'apparition de signes de mal être et de douleur, persistant au-delà de 48h suite à l'injection d'un analgésique sont appliqués et une méthode de mise à mort appropriée est utilisée.

Néanmoins, selon les données bibliographiques disponibles, les particules virales non-réplicatives utilisées dans cette étude ne sont pas virulentes et ne semblent pas provoquer de symptômes particuliers.

5854. Ce projet a pour but d'étudier comment les mécanismes mis en place lors du développement cardiaque sont réactivés lors de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte et ainsi proposera de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en vue de thérapies régénératrices chez l'adulte. 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 pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. 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 1110 souris. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et des personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être des animaux sont contrôlés.

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

5855. NLRP3 est une protéine impliquée dans la réponse inflammatoire. Quand elle est activée par un signal de danger pour la cellule, elle se lie à d'autres protéines pour former des oligomères appelées inflammasomes NLRP3. Les inflammasomes NLRP3 s'activent ensuite à leur tour et entraînent une cascade de réactions biochimiques conduisant à l'inflammation.

Les mécanismes de l'activation de l'inflammasome NLRP3 sont encore mal connus, or son activation exacerbée est à l'origine des maladies auto-inflammatoires et pourrait aussi être la cause de différentes maladies telles le cancer, le diabète ou des maladies neurodégénératives.

Nous avons identifié, *in vitro* sur des cellules en culture, des protéines et un mécanisme responsable de l'activation de l'inflammasome. Dans notre projet nous voulons confirmer *in vivo*, en utilisant une approche pharmacologique et une approche génétique, notre découverte.

Nous utiliserons un total de 216 souris dans notre projet. Ces animaux seront soumis à des modèles d'inflammation induite par une infection bactérienne ou induite par l'acide urique.

Remplacement : Dans ce projet, nous utiliserons le modèle murin. En effet, nous voulons confirmer notre découverte dans un contexte physiologique où énormément d'interactions entre différents types cellulaires entrent en jeu. De plus l'existence d'une lignée génétiquement modifiées, n'exprimant plus nos protéines d'intérêt est disponible

Réduction : Dans ce projet, nous allons tester 4 groupes de 18 souris dans 3 modèles d'inflammation différents, ce qui nous fait un total de $18 \times 4 \times 3 = 216$ souris. Ces nombres sont nécessaires afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante (ANOVA et t-test) pour comparer les niveaux sanguins des marqueurs d'inflammation et permettre une comparaison statistique de la survie des différents groupes de souris par la méthode de Kaplan Meyer et le test du logrank.

Raffinement : Des traitements antalgiques puissants seront administrés préventivement et curativement aux animaux testés. Des points limites seront également fixés, au-delà desquels l'expérience sera arrêtée et les animaux sacrifiés.

5856. La maladie de Marek est associée à un lymphome T, un cancer mortel chez la poule. Cette maladie hautement contagieuse est due à un alpha herpes virus, le virus de la maladie de Marek (MDV). Les vaccins utilisés depuis les années 1970 préviennent la formation des tumeurs, mais n'empêchent pas la réplication du virus, qui reste très présent dans les élevages à l'échelle mondiale.

Le virus est excrété par les animaux infectés via la peau, plus particulièrement via les follicules plumeux, une petite invagination cutanée à l'origine de la formation des plumes. Les animaux infectés produisent et excrètent du virus pendant plusieurs semaines à plusieurs mois. De plus, le virus, associé aux débris de peau et de plumes, est très résistant dans le milieu extérieur (plusieurs mois). L'ensemble de ces caractéristiques font que le MDV est un virus persistant et extrêmement contagieux.

Le vaccin ne permet pas d'éradiquer la maladie car il n'empêche pas l'infection d'animaux vaccinés par des souches pathogènes. Ces souches peuvent donc être diffusées au sein de troupeaux vaccinés, ce qui permet une possible évolution du virus. Cette évolution se traduit par une virulence accrue sur les animaux non vaccinés.

Le but de ce projet est d'identifier les facteurs du virus qui permettent la réplication et l'excrétion du virus par la peau, ainsi que des facteurs cellulaires permettant une forte production de virus au niveau des plumes.

Trois protéines virales, pUL47 pUL48 et pUL51, sont des candidates pertinentes pour ce rôle. En effet, pUL47 et pUL48 sont très présentes dans les follicules plumeux d'animaux infectés et peu dans les autres tissus. De plus, chez le virus de la varicelle et du zona (VZV), un herpes virus humain proche biologiquement de MDV et également excrété par la peau, les trois protéines ont un rôle dans la réplication virale dans la peau.

Le présent projet vise à tester si les protéines pUL47, pUL48 et pUL51 sont des facteurs viraux permettant au virus d'atteindre la peau et d'en être excrété.

Pour cela, les poules seront infectées par un virus sauvage ou par des virus ne codant pas pour l'une des protéines testées. L'infection sera suivie au niveau sanguin et au niveau de la peau. L'excrétion et la transmission virales seront suivies par mise en contact des animaux infectés avec des animaux non infectés. La présence virale chez ces animaux contacts sera vérifiée au niveau sanguin.

Par ailleurs, nous chercherons à purifier les protéines pUL47, pUL48 et pUL51 à partir d'épithélia de plumes afin d'identifier des protéines cellulaires recrutées par ces facteurs viraux et nécessaires à leur fonction dans ce tissu.

Le projet nécessitera au maximum 118 animaux. La règle des « 3R » a été appliquée ainsi :

Remplacement : Le passage du virus depuis le système immunitaire à la peau ainsi que l'excrétion par l'animal ne peuvent être étudiés que chez l'animal vivant, car nous ne disposons d'aucun système reproduisant ce système complexe *in vitro*.

Réduction : Le nombre minimal d'animaux nécessaire à une étude statistiquement fiable sera utilisé.

Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe et disposeront d'enrichissement (objets suspendus) dans leur milieu de vie.

5857. La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé dans l'encodage et le traitement de différentes modalités mnésiques. Ce projet concerne la comparaison des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans l'encodage rapide d'une mémoire de type épisodique chez la souris contrôle et chez des

souris modèles de la MA. Ce projet utilise des approches fonctionnelles (électrophysiologie) et comportementales. Il fait appel au transfert de gènes *in vivo* et à l'utilisation, de souris génétiquement modifiées comme modèles de la MA.

Le planning général des expériences comprend plusieurs étapes : 1) la chirurgie stéréotaxique pour le transfert de gène localisé dans l'hippocampe chez des souris contrôle et modèle de la MA, 2) des expériences de comportement de conditionnement 3) un prélèvement de tissu vivant après anesthésie pour pouvoir réaliser des analyses électrophysiologiques sur tranche des circuits de la mémoire.

Dans ce projet, nous utiliserons un nombre total de 940 souris.

Dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) les mesures suivantes seront prises: (1) L'utilisation de systèmes simplifiés (neurons en cultures ou lignées cellulaires) ne peut reproduire cette évolution lente de la maladie. Les études électrophysiologiques dans un circuit neuronal "intact" *ex vivo*, combinées à des expériences de comportement nécessitent *de facto* l'utilisation d'un modèle murin. La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus. Nous utilisons le modèle souris qui est l'espèce de rongeurs permettant d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement. Le modèle utilisé ici n'a pas de phénotype dommageable. (2) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction); (3) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement);

5858. Le syndrome Auriculo-Condylaire (SAC) est une maladie génétique rare autosomique dominante. Elle est caractérisée par des malformations bilatérales de la mâchoire et de l'oreille externe (l'oreille est en forme de point d'interrogation). Certains patients SAC présentent une dysautonomie étendue associant des apnées centrales et un dysfonctionnement du système nerveux entérique. Dans le développement de la mâchoire, la voie endothéline est importante. Plusieurs gènes sont impliqués dans cette voie : EDN1 (Endothéline 1), EDNRA (Récepteur de l'endothéline A), PLCB4 (Phospholipase C beta-4) et GNAI3 (Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Inhibiting Activity Polypeptide 3). Le gène majeur du SAC est le PLCB4. Les souris transgéniques sont largement utilisées dans l'étude des mécanismes physiopathologiques d'une maladie génétique. Dans notre cas, le modèle murin transgénique *Plcb4-ki* portant la mutation humaine récurrente permet de se rapprocher des conséquences de cette mutation fréquente chez l'Homme aussi bien pour les aspects cranio-faciaux par l'étude du développement de la mandibule que les dysautonomies associées.

Nous étudions le phénotype de ces souris. Nous regardons la fonctionnalité des chémorécepteurs centraux par la réponse ventilatoire à l'hypercapnie et des chémorécepteurs périphériques sensibles à l'oxygène par les réponses ventilatoires à l'hypoxie et à l'hyperoxie. Nous caractérisons également la nature des apnées des souris mutantes. Nous travaillons en collaboration avec une équipe partenaire pour les aspects cranio-faciaux.

L'approche *in vivo* permet de voir les effets de la mutation dans un contexte physiologique.

Le projet prévoit d'utiliser 290 souris sur les 4 ans dont 90 souris adultes pour l'entretien de la colonie et la production des souriceaux à étudier. Le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour permettre une puissance statistique dans les tests effectués, la réduction des animaux utilisés et le raffinement dans les tests utilisés. Plusieurs paramètres sont mesurés de manière simultanée, dans des conditions non invasives (sans contention et sans sédation) et en thermoneutralité. Pour toutes les mesures, l'isolement du souriceau de la mère n'excède pas une heure. Le phénotype des souriceaux est évalué de la naissance à huit jours de vie.

5859. *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la flore commensale pouvant être responsable d'infections nosocomiales et d'infections communautaires. Cette bactérie peut être responsable de septicémie (infection généralisée, propagée par voie sanguine). Une récente analyse au niveau mondial estime à 31.5 millions le nombre annuel de cas de sepsis et à 19.4 millions le nombre de cas de sepsis sévère avec potentiellement 5.3 millions de décès/an. L'émergence de la résistance à la méticilline chez les souches de *S. aureus* complique la prise en charge des patients et est un facteur de risque indépendant de mortalité dans les bactériémies.

Le traitement des infections dues à *Staphylococcus aureus* reste problématique et il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle sur le choix de l'antibiothérapie la plus efficace. De plus, la production de toxines par certains *S. aureus* augmente la virulence de la bactérie. Il apparaît donc important de trouver de nouvelles approches thérapeutiques telles que l'utilisation des anticorps.

Les anticorps sont des protéines complexes utilisées par le système immunitaire pour détecter les agents pathogènes et se fixent de manière spécifique sur leurs antigènes. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B. La reconnaissance entre antigène et anticorps est par exemple mise à profit dans la lutte contre les toxines bactériennes. Ces toxines agissent en se fixant sur des récepteurs présents à la surface des cellules de l'organisme, ce qui provoque des dérèglements importants de l'activité cellulaire. En se fixant sur ces toxines, les anticorps anti-toxiques les neutralisent et empêchent les liaisons avec les récepteurs cellulaires.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* de plusieurs associations d'anticorps ciblant différentes cibles toxiques dans le modèle de septicémie à *Staphylococcus aureus*.

Une précédente étude a été réalisée avec 8 associations différentes d'anticorps sur deux *Staphylococcus aureus* d'origine animale (un sensible (SASM) et un résistant (SARM) à la méticilline). Cette étude a montré des effets encourageants pour 3 associations d'anticorps que nous souhaitons à nouveau tester à deux nouvelles concentrations différentes sur les 2 souches de *Staphylococcus aureus* d'origine animale ainsi que sur 2 souches de *Staphylococcus aureus* d'origine humaine.

Pour cela, 396 souris Swiss femelles vont être utilisées. Avant induction de la septicémie, 2 groupes recevront un mélange d'anticorps (deux concentrations testées), 1 groupe recevra seulement l'anticorps d'intérêt contenu dans le mélange, 1 groupe

recevra un antibiotique de référence et un groupe recevra un anticorps non spécifique (animaux témoins). Soixante-douze heures après infection, la rate et les reins seront prélevés afin de déterminer la charge bactérienne.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un anticorps sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduire : le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

- Raffiner :

- Avant l'expérimentation :
 - o Choix des souches et modèles : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections de sepsis chez l'homme.

- o Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

- o Détermination des points limites.

- Pendant l'expérimentation :

- o Soins pré et postopératoire : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,1mg/kg) 30 minutes avant l'infection puis 2 fois par jour pendant toute la durée du protocole.

- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

- o Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min).

5860. Les troubles métaboliques tels que le diabète de type 2 sont un grave problème de santé publique. Chez l'homme, plusieurs études ont montré que le diabète de type 2 est associé à un déséquilibre du microbiote intestinal (ensemble des bactéries commensales du système digestif).

Chez la souris (lignée C3H/HeN), une séparation de la portée de leur mère pendant 3 h par jour pendant la période néonatale induit chez la descendance un déséquilibre du microbiote intestinal à l'âge adulte. Sachant que les défauts métaboliques apparaissent classiquement avec l'âge, nous avons décidé dans un précédent projet de faire vieillir les souris ayant ou non subi ce stress néonatal et d'étudier leur métabolisme du glucose. Nous avons ainsi pu mettre en évidence chez des souris âgées de 350 jours une intolérance au glucose associée à un déséquilibre du microbiote.

Le but de ce nouveau projet est de déterminer si seul le déséquilibre du microbiote intestinal (et non le stress induit lors de la période néonatale) est suffisant pour induire le développement de l'intolérance au glucose et, si oui, d'identifier la bactérie ou le groupe de bactéries dont l'abondance est altérée. Cette information pourrait permettre d'envisager à l'avenir de nouvelles pistes thérapeutiques pour prévenir ou traiter l'intolérance au glucose.

A cet effet, les fèces des souris ayant subi ou non le stress de séparation maternelle au cours du premier projet ont été conservées. Dans le nouveau projet, elles seront transplantées par voie orale chez des souris C3H/HeN âgées de 150 jours dépourvues de microbiote depuis leur naissance (axéniques, élevées en isolateurs stériles). La glycémie à jeun sera mesurée 3 fois à plusieurs semaines d'intervalle au cours des 4 mois suivant l'implantation du microbiote et un test de tolérance au glucose sera effectué en fin d'expérience, juste avant leur euthanasie.

Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet. Le processus étudié fait intervenir de nombreuses interactions au sein de l'hôte et nous n'avons pas connaissance, à l'heure actuelle, d'un moyen technique alternatif à l'animal pour explorer ce phénomène.

Le nombre de souris a été défini pour utiliser le minimum d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs, soit 12 souris pour chaque groupe étudié. L'étude comprendra 3 groupes, un groupe témoin axénique, un groupe recevant le microbiote des souris stressées et un groupe recevant le microbiote des souris non stressées. Le nombre total d'animaux nécessaires est donc de 36. L'expérience sera conduite en deux séries successives dans le temps, à raison de 6 souris par groupe et par série, soit 18 souris par série. Pour prendre en compte le risque de contamination accidentelle d'un isolateur, risque inhérent à ce type d'expérience, nous prévoyons 18 souris supplémentaires pour pouvoir recommencer une série en cas de contamination, ce qui porterait alors le nombre total d'animaux à 54.

Les animaux seront hébergés en cages collectives de 3 individus. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté. Un enrichissement de milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter et des buchettes de bois à ronger. Lors de l'étude, aucune douleur ou souffrance n'est attendue au regard des petits volumes de sang qui seront prélevés (deux gouttes) et du bon état de santé des souris dont les fèces ont été conservées et qui seront transplantées chez les souris du présent projet.

5861. Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble

avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques ou hypocaloriques, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation. Compte tenu des différences entre homme et femme au niveau de la physiologie du stockage et de l'utilisation des composés énergétiques, nous prévoyons d'étudier parallèlement des souris mâles et femelles.

La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle *in vivo*, sur des souris car il existe des modèles transgéniques permettant d'étudier les maladies métaboliques en lien avec le surpoids, ce qui permettra de faire des liens avec ces modèles, ou d'envisager des poursuites de notre travail avec ces modèles transgéniques.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur un régime alimentaire de 8 semaines dans des conditions de nutrition précises.

2. Réduction : l'étude portera sur des groupes mâles + femelles de souris 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). Ainsi, 80 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.

5862. Le parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infecte tous les animaux à sang chaud, incluant l'homme et la souris, et est responsable de la toxoplasmose. Chez l'homme, la toxoplasmose est une maladie opportuniste qui peut se manifester par une inflammation du cerveau chez les sujets immunodéprimés ou des malformations chez le fœtus en cas de transmission materno-fœtale. Des études récentes suggèrent un lien entre l'infection par ce parasite et le développement de maladie neurodégénératives.

Après ingestion d'aliments souillés par des parasites (sous forme de kystes), la prolifération du parasite au cours de l'infection aiguë est normalement asymptomatique chez l'homme. Cependant, dans le règne animal, une réponse inflammatoire intestinale localisée au site d'entrée du parasite (intestin grêle) peut être observée. Ensuite, la dissémination vers le cerveau et la conversion en une phase 'dormante' (kystes) correspond à l'établissement de la phase chronique, potentiellement responsable de l'encéphalite toxoplasmique (ET). Dans les 2 phases, les réponses immunitaires sont primordiales mais elles ne suffisent pas à éliminer le parasite de l'organisme et celui-ci peut persister dans le cerveau. A ce jour, il n'existe pas de vaccin commercialisé contre *T. gondii* chez l'homme. Les seules stratégies à la disposition du personnel médical reposent sur le diagnostic et le suivi des patients immunodéprimés et des femmes enceintes, conduisant le cas échéant en une prise en charge thérapeutique par un traitement médicamenteux et éventuellement une interruption médicale de grossesse.

L'objectif du projet est de comprendre les mécanismes impliqués dans les processus d'invasion initiale du parasite au niveau de la barrière intestinale ainsi que dans la réponse inflammatoire engendrée. Pour répondre à ces questions centrées sur l'interaction intestin / parasite, le recours au modèle animal est indispensable. Le modèle animal choisi est la souris, qui constitue un hôte intermédiaire naturel de *T. gondii*.

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

Remplacement : Une grande partie du projet scientifique, non-présenté ici, utilise des procédures alternatives. En effet, nous avons également des approches *in vitro* utilisant des cellules ou des explants que nous pouvons infecter par *T. gondii*, permettant de disséquer les processus d'invasion de l'épithélium intestinal de manière plus efficace par des approches multiples.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins, de mêmes âge et sexe, réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Lors du sacrifice, les organes ou parties d'organes non requis pour l'expérience en cours, ainsi que le matériel traité non consommé, sont conservés pour d'autres utilisations éventuelles, constituant une bio-banque accessible à l'équipe ou aux collaborateurs, prévenant l'utilisation d'autres animaux.

Raffinement : Les méthodes d'analyses utilisées, les plus avancées, permettent d'obtenir une précision dans les mesures conduisant à réduire la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux utilisés. Il en est de même pour les stratégies expérimentales, pour lesquelles certains protocoles permettent de réduire la variabilité expérimentale (par exemple, l'utilisation de souris modifiées génétiquement par rapport à des souris sauvages ayant subi une déplétion). Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage).

La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte si nécessaire de points-limites préalablement définis (surveillance quotidienne post-infection, pesée, etc...). Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est de 1076 souris sur 5 ans.

5863. Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés à l'animal de rente, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le bovin dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement, dans divers tissus, organes et/ou fluides de l'organisme, évaluer la biodisponibilité du produit et/ou déterminer le temps d'attente pour la sécurité du consommateur. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'animal est le bovin jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (étude de résidu, évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le bovin sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

-toutes les administrations et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

-depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

-les points limites sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour sa protection,

-la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

5864. La qualité des écosystèmes et leur préservation est en lien directe avec la santé. Dans ce cadre, il est important d'établir des diagnostics de l'état de ces écosystèmes et également de prédire l'impact potentiel des activités anthropiques sur ces écosystèmes. La toxicité des effluents, des produits chimiques, des phytosanitaires et biocides ou des substances sur les écosystèmes aquatiques est évaluée en utilisant différents modèles biologiques comme des bactéries, des végétaux, des invertébrés et des poissons. Les effets recherchés peuvent être aigus (mort) ou chroniques (croissance, développement larvaire, bioamplification). Ces essais rentrent dans le cadre de nombreuses réglementations (CLP, REACH, directive biocide, directive phytosanitaire) et permettent d'évaluer les risques pour l'environnement. Le présent projet correspond à la Bioaccumulation d'une substance chez le poisson par une exposition via le milieu aquatique ou via la voie alimentaire en suivant la ligne directrice OCDE 305 ou une méthode équivalente. Il n'existe pas de modèle cellulaire permettant de représenter la bioaccumulation au sein des organismes.

Dans le cadre de ces essais, un test complet nécessite au maximum 600 poissons. Le nombre maximum de poissons sur 5 ans sera de 18 000. Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, la ligne directrice préconise l'utilisation de 3 groupes de concentration (témoin, forte concentration, faible concentration) et non d'une gamme de 5 concentrations. Dans un contexte de raffinement, les poissons pourront également être utilisés, après euthanasie, en biologie moléculaire pour la recherche de biomarqueurs ou en imagerie MALDI pour déterminer la localisation et les mécanismes d'actions des substances testées

5865. Bien que peu fréquent (entre 0,1 et 1 événement pour 1000 plongées ; \approx 400/an en France), l'accident de décompression (ADD) entraîne le plus souvent une invalidité permanente (de type hémiplégie, paraplégie ou tétraplégie), voire le décès, et représente ainsi le risque le plus grave chez le plongeur subaquatique. L'ADD touche non seulement les plongeurs loisir, mais aussi l'ensemble des personnes exposées à des différentiels de pression importants : patients et personnel fréquentant des chambres hyperbares, plongeurs militaires, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers... Depuis les travaux de Paul Bert, il est admis que l'ADD est la conséquence de la formation de bulles dans la circulation sanguine, se comportant comme des corps étrangers. Les paliers de décompression qu'effectuent les plongeurs lors du retour vers la surface visent à prévenir cet accident en diminuant la formation de bulles intravasculaires. Cependant, des ADD malgré le respect des procédures de décompression continuent d'être rapportés, soulignant l'intérêt d'améliorer la prévention et le traitement de cette pathologie.

A l'échelle de la population, le risque d'ADD est statistiquement proportionnel à la quantité de bulles circulantes. Cette dernière dépend à la fois de la quantité de gaz dissous dans l'organisme pendant la plongée et des cinétiques de transfert des gaz dissous entre les différents compartiments de l'organisme : depuis les tissus (où ils sont dissous) jusqu'aux poumons (par lesquels ils sont éliminés). Or, pour une même plongée, la quantité de bulles détectées dans la circulation est variable d'une personne à l'autre. Les raisons de cette forte variabilité interindividuelle restent à ce jour méconnues.

A l'échelle de l'individu, cette relation est beaucoup moins nette, suggérant que la présence de bulles circulantes est nécessaire mais ne suffit pas à déclencher un ADD. La capacité des bulles à générer un ADD serait donc dépendante de l'intervention des facteurs individuels, innés ou acquis.

L'objectif de ce projet vise à mieux cerner les mécanismes physiopathologiques reliant la présence de bulles intravasculaires au développement de l'ADD.

Dans ce but, des rats seront soumis à des plongées fictives en chambre hyperbare, puis sélectionnés en fonction de leur résistance à l'ADD afin de dégager une lignée spécifiquement résistante à celui-ci. Différentes procédures expérimentales sont prévues dans ce travail afin de caractériser le phénotype commun chez les rats résistants. Ces analyses physiologiques permettront une meilleure compréhension des mécanismes de l'ADD ainsi que la possibilité d'identifier des individus résistants (ou susceptibles) à l'ADD.

Dans chaque procédure expérimentale, les animaux sont donc soumis à une exposition hyperbare suivie d'une période d'observation, après quoi les individus résistants à l'ADD sont sélectionnés pour la reproduction. Après sevrage de leurs descendants, les animaux sont alors anesthésiés et des prélèvements sanguins et tissulaires sont effectués avant l'euthanasie de l'animal. A travers les différentes procédures, environ 2000 rats (52 mâles et 52 femelles pour le lot initial puis jusqu'à plus de 200 animaux par génération en fonction de la taille des portées) seront utilisés dans le cadre de ce travail scientifique. Conformément à la règle des 3R,

- Le recours à l'expérimentation sur animaux vivants et non anesthésiés a été limité autant que possible.
- Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en limitant à la fois l'effectif de chaque génération et le nombre de générations (minimum nécessaire pour permettre la sélection d'un trait phénotypique complexe).
- Des points limites ont été définis afin de limiter au minimum nécessaire la souffrance infligée aux animaux (notamment liée à l'accident de décompression)

5866. La perte de l'intégrité vasculaire participe au développement des nombreuses pathologies qui incluent l'inflammation, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et les maladies cardiovasculaires. Ce projet a pour objectif l'identification de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Ceci dans le but ultime de définir des cibles thérapeutiques pour limiter l'apparition d'une dysfonction endothéliale et le développement consécutifs des pathologies associées. Nos résultats récents ainsi que ceux d'autres équipes montrent que la voie de signalisation Wnt est nécessaire à l'intégrité de l'endothélium vasculaire cependant les acteurs moléculaires impliqués sont mal connus. Ce projet consistera à caractériser le phénotype vasculaire de souris déficientes pour plusieurs acteurs moléculaires de la voie de signalisation Wnt (Pdzrn3, et ROR2) dans le but de caractériser leur rôle dans les cellules endothéliales. Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 735 souris transgéniques. Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée n'est reproduite et lorsque cela est possible, les études conceptuelles sont réalisées *in vitro* sur des cellules en culture avant d'être testée *in vivo*. Cependant la physiologie de l'endothélium est complexe et mets en jeu des interactions multiples entre les cellules de la paroi vasculaires et le sang qui ne peuvent pas être reproduites *in vitro* de façon satisfaisante. Suite à notre expérience, 10 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. La souffrance des animaux est réduite par l'usage d'anesthésiques et d'antalgiques adaptés pour la réalisation de procédures douloureuses.

5867. La reproduction chez les caprins est saisonnière ; elle a lieu 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 sur le marché. La mise à la reproduction hors saison sexuelle (contre saison) est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Des techniques (traitements hormonaux, effet mâle, traitements lumineux et mélatonine) sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont la pratique la plus efficace pour dessaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal actuel oriente vers une moindre utilisation des hormones en élevage, dans l'objectif de réduire leurs résidus dans les produits animaux et le risque de contamination de l'environnement via les effluents.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment « l'effet mâle ». L'effet mâle consiste à stimuler l'activité ovulatoire de chèvres au repos sexuel par leur exposition à des boucs sexuellement actifs. Toutefois, cette pratique nécessite un nombre important de mâles dont les manipulations sont chronophages et contraignantes pour l'éleveur, ce qui représente un frein pour le développement de cette technique en élevage, notamment pour l'application de l'insémination artificielle. Puisque l'effet mâle est dépendant de signaux olfactifs émis par le mâle, il serait possible d'utiliser les molécules olfactives impliquées dans cet effet mâle pour la mise en œuvre « d'un effet mâle sans mâle ».

Récemment, nous avons identifié des molécules olfactives présentes dans la toison, les sécrétions ante-orbitales et l'urine de boucs entiers sexuellement actifs. Nous voulons à présent caractériser leur activité biologique (capacité à stimuler l'activité sexuelle des chèvres), puis définir leur « mode d'emploi ». Cette demande d'expérimentation a comme objectif de mettre au point un test de screening *in vivo* (aucune méthode *in vitro* n'est disponible à ce jour) pour nous permettre de présélectionner les molécules (ou bouquet de molécules) d'intérêt sur lesquelles nous réaliserons par la suite des études plus approfondies.

Un total de 10 chèvres de race alpine, adultes et tariées sera utilisé. Des prélèvements sanguins sériés (toutes les 15 minutes pendant 5 heures) seront réalisés dans la veine jugulaire (au niveau du cou) des chèvres pour suivre la réponse hormonale à la stimulation par le bouc ou son odeur. L'objectif sera de déterminer le nombre minimum de prélèvements de sang qui seront nécessaires pour observer un effet.

Remplacement

La stimulation de l'activité sexuelle de la chèvre par effet bouc est un phénomène naturel mais complexe impliquant plusieurs organes (système olfactif, système nerveux central, hypophyse, ovaires), ne pouvant pas être étudié *in vitro*.

Réduction

Un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre d'animaux.

Raffinement

Pour les prélèvements sanguins, des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, application d'un baume antiseptique et cicatrisant).

5868. La narcolepsie avec cataplexie (NC) est un trouble du sommeil rare et handicapant. Cette affection est induite par la destruction spécifique des neurones produisant l'orexine. Cette pathologie est associée à des facteurs génétiques, environnementaux et biologiques, qui pointent vers une origine auto-immune. Par ailleurs, en 2009, la campagne de vaccination contre le virus de grippal H1N1 a abouti à une augmentation drastique du nombre de cas de narcolepsie en Europe.

Pour étudier les mécanismes immunitaires impliqués dans la NC nous avons développé un modèle de souris génétiquement modifié, recréant la perte spécifique des neurones produisant l'orexine. Ce modèle offre une opportunité unique d'étudier les liens entre vaccination et narcolepsie. Collectivement, ces études permettront de disséquer les mécanismes capables d'aboutir à la destruction des neurones à orexine et de comprendre quel est l'implication des facteurs environnementaux, tels que la vaccination antigrippale. Cela pourrait également nous permettre de tester, dans une approche préclinique, certains traitements dans la NC.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 2430 animaux sur 3 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans le fonctionnement du système immunitaire. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

3-Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

5869. Le glioblastome, tumeur cérébrale gliale de grade élevé, a une incidence de 3 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants avec une fréquence plus importante entre 45 et 70 ans. Conventionnellement, ces tumeurs sont traitées par la neurochirurgie puis par radiothérapie avec chimiothérapie. Malgré les bénéfices apportés par la radiothérapie qui reste le traitement de référence, la survie médiane des patients atteints de glioblastome est inférieure à un an, le plus souvent due à une récurrence à l'intérieur même du volume irradié. L'échec des traitements actuels impose donc de développer de nouvelles stratégies de thérapie comme la thérapie génique. Celle-ci, dont le premier traitement a été approuvé par les autorités européennes, est une stratégie thérapeutique consistant, entre autre, à transférer et faire exprimer un gène d'intérêt (appelé gène thérapeutique) dans une cellule afin de traiter une maladie. Ce principe requiert un contrôle fin de l'expression du transgène afin d'éviter l'apparition d'effets secondaires liés à une expression excessive de la protéine thérapeutique. Or les systèmes de régulation actuellement disponibles n'ont jamais pu être transférés vers une application clinique pour des raisons soit de toxicité liée à l'inducteur du transgène ou de difficulté à réguler finement son expression.

L'équipe a récemment développé un système de régulation génique (appelé AARE-gène) qui permet de réguler l'expression d'un gène thérapeutique via la nutrition. L'utilisation de ce système afin de réguler l'expression d'un gène tueur de tumeurs a permis d'en valider l'efficacité sur des cellules de gliomes humains. Désormais ce projet consiste à étudier le potentiel de ce nouveau système tout d'abord sur la souris Nude porteuse de xénotransgènes tumoraux (lignées de glioblastome humain) puis sur un modèle de tumeur induite par un agent carcinogène hépatique afin de valider notre système dans plusieurs types de cancer. Ce protocole vise à réaliser la preuve de concept sur modèle *in vivo* du système AARE-Gène et ainsi d'apporter un nouvel élément de régulation de l'expression génique en thérapie génique. Etant donné que l'efficacité du système AARE-Gène a été préalablement validée en cellules en culture, il n'existe pas à ce stade du projet, de solution alternative à l'expérimentation animale.

Ce projet sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3r (Remplacement, Réduction, Raffinement). Ces expériences vont permettre de valider des résultats déjà obtenus *in vitro* et sont nécessaires pour évaluer l'impact de différents régimes testés sur l'organisme entier (Remplacement). Le nombre d'animaux (au total 228) utilisés pour démontrer l'intérêt d'utiliser le système AARE-Gène dans le domaine du cancer est calculé, pour chaque expérience, au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, consommation...) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués avec un nombre d'animaux suffisant statistiquement (Raffinement).

5870. Les dystonies sont des affections neurologiques rencontrées chez l'homme et à l'origine de troubles de la posture retentissant de façon majeure sur la qualité de vie des patients. Ces maladies restent relativement rares et leur physiopathologie

mal connue, ce qui explique l'efficacité partielle des traitements proposés jusqu'à ce jour dans cette indication. Les anticholinergiques sont des médicaments qui diminuent la symptomatologie des patients souffrants de dystonie mais au prix d'effets secondaires parfois incompatibles avec une qualité de vie acceptable. Les benzodiazépines sont d'autres traitements qui peuvent réduire de façon partielle et aspécifique l'intensité des troubles dystoniques. D'autre part, chez l'homme, des lésions de certaines structures cérébrales profondes comme le striatum, sont souvent responsables de la survenue de dystonies secondaires. L'organisation de ce striatum est complexe. Il contient des neurones qui possèdent des récepteurs aux drogues citées plus haut (acétylcholine et benzodiazépines). Il est très probable que des modifications subtiles de l'activité de ces récepteurs puissent jouer un rôle dans la survenue des dystonies.

Au cours de ce projet, nous réaliserons chez le primate des microinjections dans le striatum de drogues qui agiront sur les récepteurs à acétylcholine ou sur les récepteurs aux benzodiazépines. Nous évaluerons les effets de ces injections à l'aide d'échelles cliniques adaptées à l'animal et nous réaliserons des enregistrements de l'activité électrique des neurones du striatum ainsi que d'autres structures cérébrales qui lui sont connectées. Ces enregistrements seront effectués avant et après injection afin de corrélérer les troubles cliniques observés aux modifications d'activité électrique des neurones.

Cette étude sera réalisée sur 4 primates (nombre d'animaux minimum nécessaire pour effectuer une analyse statistique des données obtenues) d'espèce *Macaca fascicularis*.

L'expérimentation sur l'animal est nécessaire ici car nous ne pouvons réaliser ce type d'enregistrements électrophysiologiques dans un but de recherche chez l'homme. Le choix de l'espèce animale est sous tendu par la forte homologie anatomique et fonctionnelle des structures cérébrales motrices entre le macaque et l'homme. En effet, des études ont déjà été menées chez le rongeur dans le domaine des dystonies. Il existe des modèles pharmacologiques et un modèle de dystonie génétique chez la souris. Cependant, dans ce dernier modèle, les rongeurs n'expriment pas de symptôme clinique. Dans les modèles pharmacologiques, les symptômes présentés par les rongeurs ne correspondent pas d'un point de vue phénotypique aux symptômes présentés par les patients souffrants de dystonie, ce qui limite la transposition des résultats obtenus chez le rongeur à l'homme. A l'inverse, lors des études menées dans le domaine des mouvements anormaux, l'utilisation de macaques a souvent permis de transposer les résultats à l'homme. L'exemple le plus important est celui du modèle primate de maladie de Parkinson avec une similitude troublante entre les signes cliniques présentés par ces animaux intoxiqués au MPTP et les signes cliniques présentés par les patients atteints de la maladie de Parkinson (tremblement, akinésie, rigidité). C'est pourquoi, du fait des fortes homologies anatomiques et physiologiques entre les macaques et l'homme, il nous sera plus facile de comparer les signes cliniques entre ces 2 espèces et de transposer les résultats obtenus chez le singe à l'homme. Les expérimentations animales réalisées chez le rongeur nécessitent souvent l'utilisation d'un nombre important d'animaux afin de faire plusieurs contrôles qui seront autant de garanties pour la validité et la pertinence des résultats. L'utilisation de primates ne permet pas de faire plusieurs groupes d'animaux en guise de contrôle. Il est nécessaire de réduire le nombre d'animaux au maximum tout en gardant un nombre minimum nécessaire à la validité des résultats. En général, les expérimentations sont effectuées sur 2 à 4 animaux notamment lors d'études comportementales, pharmacologiques et électrophysiologiques. Cela nous permet de nous assurer de la bonne reproductibilité des résultats et donc des faibles variations inter individuelles des résultats au sein d'une même espèce. En général, chaque animal est son propre témoin (comportement et enregistrements électrophysiologiques observés par hémicorps ou hémisphère selon le côté où est infusé la drogue et le sérum salé). La répétition des séances d'enregistrements comportementaux et électrophysiologiques chez un même animal nous permet d'avoir suffisamment de données pour effectuer les analyses statistiques sans avoir à utiliser un grand nombre d'animaux. 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 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.

5871. 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 2553 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.

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.

5872. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent à la Réunion un problème de santé publique majeur. La mortalité par AVC y est deux fois plus importante qu'en métropole. Ces AVC sont des complications cliniques de l'athérosclérose. Une cause essentielle de l'athérosclérose est un excès de cholestérol correspondant à une élévation permanente (dyslipidémie) ou transitoire (aliments riches en graisse) des LDL. Ces lipides s'accumulent localement sous forme de plaques appelées athéromes. Outre une meilleure hygiène de vie, les principaux traitements médicaux reposent sur la prise d'antiagrégants plaquettaires et de statines permettant de normaliser le taux de LDL cholestérol et des lipides. Des molécules hypocholestérolémiantes issues de végétaux sont aujourd'hui utilisées, il s'agit d'analogues végétaux du cholestérol.

Nous proposons dans cette expérience d'utiliser des polyphénols extraits de *Doratoxylon apetalum* et de *Antirhea borbonica* deux plantes endémiques des Mascareignes en prévention des risques cardiovasculaires. Les extraits riches en polyphénols de ces deux plantes ont montré des propriétés anti oxydantes et anti inflammatoires sur des modèles cellulaires et animaux. Les polyphénols sont des molécules naturelles d'origine végétale connues en particulier pour leurs propriétés anti oxydantes participant à la diminution des risques cardiovasculaires. Outre cette activité anti oxydante, certains composés polyphénoliques ont montré des effets hypocholestérolémiants dans des modèles animaux. L'utilisation de ces composés phénoliques constitue une thérapie innovante dans le traitement et la prévention des risques cardiovasculaires.

Nous souhaitons également tester sur les souris l'effet hypocholestérolémiant de molécules extraites de la matière cireuse de canne à sucre. Le Policosanol, riche en alcools gras, est prescrit contre l'hypercholestérolémie et pour la prévention des troubles cardiovasculaires. A travers cette expérience, nous souhaitons mettre en évidence cet effet dans le cas de la pathologie de l'athérosclérose.

Un modèle de souris n'exprimant pas le gène ApoE (souris ApoE^{-/-}) sera utilisé. Ce modèle présente l'avantage de développer spontanément des plaques d'athérome et un régime riche en graisse permet d'accélérer la progression des lésions artérielles. Pendant 12 semaines, les souris (mâles, 40 au total) âgées de 6 à 8 semaines seront soumises à un régime riche en graisse et des molécules provenant de la biodiversité végétale terrestre leur seront administrés quotidiennement par gavage. Le profil lipidique ainsi que la taille des lésions seront évalués.

Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

Remplacement : la culture cellulaire est pratique pour répondre aux hypothèses mécanistiques mais ne permet pas de reproduire la complexité physiologique des maladies limitant l'étendue des hypothèses testables. Il est nécessaire de passer à un modèle animal qui permet de mieux comprendre les effets de molécules bioactives sur des paramètres physiologiques à l'échelle de l'organisme.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques.

Raffinement : les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale.

5873. Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés à l'animal de rente, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le porc dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement, dans divers tissus, organes et/ou fluides de l'organisme, évaluer la biodisponibilité du produit et/ou déterminer le temps d'attente pour la sécurité du consommateur. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'animal est le porc jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de

l'étude (étude de résidu, évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le porc sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

- la chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

- toutes les administrations et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour sa protection,

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

5874. Une entérostomie est un abouchement d'un segment d'intestin à la peau. Ce procédé chirurgical est réalisé suite à de multiples causes: lésions tumorales, maladies inflammatoires, cause traumatiques, causes congénitales. Le segment concerné peut être le colon (colostomie), la partie iléale de l'intestin grêle (iléostomie) ou beaucoup plus rarement la partie jéjunale de l'intestin grêle (jéjunostomie). Une entérostomie peut être temporaire ou définitive. L'entérostomie est terminale lorsque la continuité digestive est interrompue (section complète de l'intestin) et latérale lorsque la continuité digestive est conservée (section incomplète de l'intestin).

Aujourd'hui dans le monde, de très nombreux patients sont porteurs d'une entérostomie. On dénombre ainsi, à titre d'exemples, 308 000 patients porteurs d'une entérostomie aux Etats-Unis, 110 000 au Royaume Uni et 70 000 en France. Malgré l'importance du nombre de patients concernés, la technique chirurgicale n'a pas évolué depuis plus de 100 ans.

Un nouveau dispositif médical ayant pour objectif d'améliorer cette technique a été mis au point. Ce dispositif est un système d'aide à la confection des entérostomies. Il comporte deux variantes : l'une destinée à la confection d'une entérostomie terminale et l'autre à la confection d'une entérostomie latérale. Il a pour objectif de faciliter le geste chirurgical.

Ce projet se propose donc d'évaluer ce nouveau dispositif permettant de réaliser des entérostomies sans sutures afin de valider la faisabilité de la mise en place du dispositif dans 2 cas : l'iléostomie (au niveau de l'intestin grêle) et la colostomie (au niveau du colon).

L'étude sera réalisée sur 12 Porcs (Pietrain, 4-6 mois, 45 +/- 5 kg) répartis équitablement dans les 4 groupes étudiés : - Iléostomie terminale (n=3) ; - Iléostomie latérale (n=3) ; - colostomie terminale (n=3) ; - colostomie latérale (n=3). Le nombre d'animaux a été défini afin de valider une preuve de concept, celui-ci est donc en adéquation avec la règle de la Réduction du nombre d'animaux.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure).

5875. Le but de ce projet est de former le personnel à la manipulation des différents modèles animaux utilisés dans une animalerie confinée. Le travail en animalerie hautement confinée demande une connaissance particulière des procédures et gestes techniques inhérents à l'expérimentation animale et à la sécurité biologique, tant par les contraintes liées au confinement que par les équipements de protection individuels. C'est la raison pour laquelle la formation nécessite de manipuler chaque modèle animal pendant une durée de 3 semaines/modèle.

La formation est assurée par un formateur compétant et titulaire du Niveau 1 en expérimentation animale.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Cette formation est indispensable pour permettre au nouveau personnel recruté de travailler au sein de l'animalerie.

Le nombre d'animaux utilisés (10 souris, 8 hamsters et 6 cobayes) est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes et fréquence des prélèvements tolérés.

Les souris utilisées dans ces procédures sont, dans la mesure du possible, des souris de réforme, les hamsters et cobayes proviennent d'élevage agréés sans critère. Un enrichissement de confort, de stimulation et alimentaire seront systématiquement utilisés.

Ce projet comportera 10 procédures identiques de formation nécessitant au total 240 animaux (100 souris, 80 hamsters, 60 cobayes).

5876. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC), définis par une interruption brutale de l'irrigation sanguine du cerveau, sont responsables de la première cause de handicap de l'adulte, de la deuxième cause de démence et de la troisième cause de décès (OMS rapport mondial sur les maladies non transmissibles 2014). L'infarctus cérébral (IC) représente près de 80% des AVC.

La reperfusion rapide du territoire cérébral ischémique - notamment par l'administration d'agents thrombolytiques, anticoagulants et antiplaquettaires, ou par thrombectomie endovasculaire - est essentielle pour limiter les lésions tissulaires. Cependant, la reperfusion n'est pas seulement bénéfique puisqu'elle est accompagnée d'une importante extravasation de leucocytes due à la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) causée par l'activation et / ou l'endommagement des cellules endothéliales. L'infiltration et l'activation des leucocytes, en particulier des neutrophiles, a des conséquences considérables sur la survie du tissu cérébral. Les neutrophiles libèrent des dérivés réactifs de l'oxygène et de puissantes protéases (élastase, métalloprotéases, endopeptidases, ...) qui contribuent à la destruction et / ou au dysfonctionnement cérébral. De plus, la formation de «Neutrophil Extracellular Traps» ou NETs prolonge l'activité de ces neutrophiles après leur propre mort. Il est important de noter que l'activation des neutrophiles et leur capacité à former des NET sont significativement augmentées chez les sujets diabétiques.

Le but de ce projet est de contrôler et de prévenir l'action délétère des leucocytes pendant la phase de reperfusion, sur le cerveau lui-même et / ou sur la BHE, et donc de limiter la lésion de reperfusion. Afin de réaliser cela, nous allons avoir recours à l'utilisation d'un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat ainsi que la souris. En effet, à l'heure actuelle des connaissances, il est difficile de trouver un modèle autre que le modèle *in vivo*, pouvant répondre à notre problématique. 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 d'environ 250 rats et 250 souris. Des mesures (utilisation d'analgésique, enrichissement des cages, etc.) ont été prises 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 établis afin d'intégrer au maximum la préconisation des 3 R.

5877. Le RCIU (Retard de Croissance Intra Utérin) 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.

Notre premier projet centré sur un modèle de RCIU induit par un régime hypoprotéidique (LPD : Low Protein Diet) chez la ratte gestante a donné des résultats très intéressants.

Nous avons montré que ce modèle induisait un retard de croissance et des lésions cérébrales (dues en particulier à un arrêt de la maturation des oligodendrocytes, à un retard de myélinisation et à une modification des cellules microgliales). 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 sont conformes à ceux retrouvés en clinique néonatale chez les enfants grands prématurés, indiquant la bonne représentativité du modèle.

Des molécules potentiellement protectives sur le cerveau et/ou le poumon ont par la suite été testées (carbétocine, curcumine) avec des résultats très encourageants car réduisant de nombreux marqueurs de la pathologie au niveau cérébral (carbétocine) et pulmonaire (curcumine).

L'objectif est à présent de transférer ce modèle chez la souris, et d'y comparer les effets dans le poumon et le cerveau.

A terme, l'utilisation d'un modèle souris nous permettra le passage sur des animaux transgéniques, beaucoup plus développés chez la souris que chez le rat. L'utilisation d'animaux transgéniques sera un outil supplémentaire pour confirmer les mécanismes impliqués dans les dysfonctionnements dus au RCIU et à l'étude des voies de signalisations susceptibles d'être impliquées.

Une première expérimentation afin de tester le modèle souris utilisera 4 portées de souris C57BL/6 (24 souriceaux). Cette première expérimentation nous permettra également de vérifier d'un point de vue statistique le nombre d'animaux nécessaire à la poursuite du projet.

Par la suite, si le modèle est validé, le nombre total d'animaux utilisé est estimé à :

42 souris C57BL/6 gestantes.

336 souriceaux nés de ces souris.

Afin de respecter la règle des 3R (remplacer réduire, raffiner):

En accord avec une chercheuse de notre unité et le personnel animalerie, nous avons décidé d'utiliser un lot de souris de souche C57BL/6 déjà présent dans notre animalerie. Ainsi, nous n'aurons pas besoin de recommander des souris afin d'effectuer nos expérimentations. Ces animaux font partie de l'élevage de notre animalerie, n'ont jamais été expérimentés et sont déjà acclimatés à leur lieu de stabulation.

Les mises en accouplement et le relevé des plugs seront effectués par le personnel compétent de l'animalerie.

Une fois la mise bas effectuée, les souriceaux nés des accouplements seront expérimentés selon les procédures et après leurs sacrifices, les mères pourront être remises en accouplement, ce qui nous permettra d'utiliser moins d'animaux.

Afin d'exploiter au maximum la première expérimentation de nombreuses données seront relevées et utilisées. Cela nous permettra entre autre de confirmer le retard de croissance attendu et de bien le décrire.

Pour les mères gestantes : réaction au régime, poids pendant la grossesse, comportement nourricier une fois la parturition effectuée.

Pour les souriceaux: poids, comparaison phénotypique de développement et maturité, étude du développement cérébral : poids du cerveau, étude de la myélinisation et de la lignée oligodendrocytaire, de l'inflammation et de la microglie, étude du développement pulmonaire : mesure de l'alvéolisation.

Ces critères seront les premiers à être étudiés car les plus potentiellement intéressants en comparaison avec notre précédente étude chez le rat.

Pour cette première expérimentation, un « time-point » précis d'étude a été retenu en particulier (P10). Celui-ci nous permet de maximiser le nombre de données récoltées à la fois pour le développement pulmonaire (poumons en cours d'alvéolisation) et cérébral (cerveau en cours de myélinisation).

Afin de raffiner notre expérimentation et de réduire la douleur de nos souriceaux, nous avons décidé d'utiliser un dispositif breveté de ventilation mécanique permettant l'inhalation contrôlée d'aérosol de substances médicamenteuses pour les rongeurs. Ces inhalations nous semblent être une manière d'éviter des procédures de traitement plus Invasives (injections).

Néanmoins certaines molécules ne sont pas nébulisables, et des injections intrapéritonéales seront également utilisées.

L'ensemble des animaux est suivi sur toute la durée du projet par l'équipe animalerie compétente en plus des expérimentateurs impliqués dans le projet.

5878. L'embolisation et la chimioembolisation artérielles sont deux procédures de radiologie indiquées pour le traitement des tumeurs hypervasculaires telles les fibromes utérins, méningiomes ou tumeurs hépatiques. Sous guidage radioscopique, un cathéter est mené par voie endovasculaire depuis l'artère fémorale jusqu'aux vaisseaux irriguant la lésion. On injecte alors dans le cathéter un agent occlusif (embolisation) ainsi qu'une solution médicamenteuse (chimio-embolisation) qui vont détruire la tumeur. Pour les tumeurs du foie, la nature des agents occlusifs et médicamenteux a considérablement évolué dans les 5 dernières années : on est passé de fragments de gélatine découpés grossièrement et mélangés à la main de façon instable avec des anticancéreux classiques, à des microsphères synthétiques calibrées pré-chargées à une certaine dose d'anticancéreux de dernière génération.

Les agents d'embolisation sont des dispositifs médicaux dont la mise sur le marché est soumise au marquage CE. La Directive Européenne 93/42/CEE stipule qu'il est nécessaire d'étudier la toxicité, la compatibilité des matériaux utilisés en fonction des tissus, des cellules et des liquides biologiques en contact, et en fonction de la destination du dispositif médical.

L'objectif du projet est d'évaluer la tolérance locale de particules pour l'embolisation et chimioembolisation dans un modèle sain non tumoral d'embolisation de l'artère hépatique chez le porc. Les essais réalisés pourront faire partie d'un dossier pour une demande d'approbation en Europe et aux USA.

Le modèle d'embolisation de l'artère hépatique chez le porc est le plus couramment utilisé pour l'évaluation des agents d'embolisation. Il présente des similitudes satisfaisantes avec l'homme en termes d'anatomie et physiologie vasculaires. La procédure peut être réalisée dans les mêmes conditions et avec les mêmes matériels que chez l'homme.

Le nombre total d'animaux prévu pour le projet est de 7 sur la base du nombre d'animaux par groupe d'étude nécessaires pour une analyse statistique et du nombre de groupes d'études prévus au protocole.

Principe des 3R :

- Remplacement : Les études préliminaires de cytotoxicité des particules peuvent être réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules. Les essais concernant les effets locaux après implantation ne peuvent être effectués que sur des modèles *in vivo*, se rapprochant le plus possible des conditions finales d'utilisation des produits.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données et limiter la variabilité inter-individus. Ce nombre est au minimum de 3 animaux par groupe d'étude (Norme ISO-10993-6). Quand cela est possible, les groupes contrôle sont constitués par des groupes d'animaux "historiques" pour lesquels les données mesurées sont déjà disponibles.
- Raffinement : La procédure d'embolisation est réalisée sous anesthésie générale. Un protocole de suivi des animaux et de prise en charge de la douleur, avec évaluation quantitative des paramètres de suivi pour définir le point limite, sont utilisés afin de réduire au maximum la douleur animale. Ils seront hébergés en cases individuelles avec des cloisons ajourées pour se voir et l'enrichissement du milieu sera réalisé à l'aide de paille pour qu'ils puissent jouer.

5879. La pollution de l'air est devenue un problème de santé publique majeure dans le monde entier. Parmi les composants à risque de la pollution atmosphérique, les particules fines de diamètre inférieur à 2,5 µm (PM2.5) ont été reconnues très nocives et peuvent être responsables de lésions pulmonaires importantes, de cancers, mais également de maladies cardiovasculaires. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé qu'en 2011, environ deux millions de morts étaient liées à l'exposition aux particules fines issues de la pollution atmosphérique.

Face à de tels impacts sur la santé, il est primordial de développer des recherches innovantes permettant de limiter les dommages sur l'organisme.

Dans la présente demande, nous allons étudier l'efficacité de produits antioxydants et anti-inflammatoires contre les méfaits de la pollution, chez les rongeurs (souris et rats). Au préalable, il est nécessaire de mettre en place un modèle expérimental reproductible qui permette de mimer l'impact de la pollution chez le rongeur.

Dans un premier temps, deux modèles expérimentaux vont être testés et optimisés : administration intra-trachéale (instillation) et administration intra-nasale. Pour chaque modèle, 24 rats ou souris seront nécessaires pour vérifier les lésions provoquées à différents temps et pour deux doses de PM2.5 (4 groupes / 6 animaux par groupe, incluant 2 groupes contrôle avec véhicule sans PM2.5).

Par la suite, un modèle d'inhalation (en cours de développement) sera testé afin de mimer les conditions réelles d'exposition. La procédure détaillée fera l'objet d'un avenant à cette demande d'autorisation de projet.

Une fois le modèle validé, l'efficacité de différents produits innovants, préalablement testés *in vitro*, sera évaluée. Afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, nous allons utiliser 40 rats ou souris par essai incluant des groupes de 8 animaux (4 groupes expérimentaux traités avec différentes doses + 1 groupe contrôle non traité), à raison de 4 essais au maximum par an pour les rats et 4 essais pour les souris, donnant un nombre total d'animaux de 848 rats et 848 souris sur 5 ans.

Les traitements seront administrés par voie orale et les animaux seront suivis quotidiennement pour vérifier leur état de santé général et leur bien-être.

Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

- Remplacement : Nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Les tests *in vitro* permettent de répondre aux hypothèses mécanistiques mais ne permettent pas de reproduire la complexité physiologique des lésions/maladies. Il est nécessaire de passer à un modèle animal afin de mieux comprendre les effets de molécules bioactives à l'échelle de l'organisme.

- Réduction : les expérimentations sont conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études statistiques fiables.

- Raffinement : les animaux sont placés dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour/nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée, et sont nourris *ad libitum*. Toute manipulation invasive sera réalisée sous anesthésie générale et la douleur postopératoire sera soulagée par l'injection d'analgésique (buprénorphine). L'analgésie sera prolongée en fonction des observations quotidiennes.

5880. L'horloge biologique principale, localisée chez les Mammifères dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN), permet aux individus d'être en phase avec les changements environnementaux et assure l'organisation temporelle de nombreuses fonctions physiologiques.

L'alternance veille/sommeil est une fonction rythmique contrôlée par les SCN et d'autres structures cérébrales dont les noyaux monoaminergiques, *ie* sérotoninergiques du Raphé et noradrénergiques du Locus Cœruleus. S'il est clair que les états de vigilances sont en antiphase chez les espèces diurnes et nocturnes, on ne connaît pas, à l'heure actuelle, le(s) support(s) anatomique(s) dont le fonctionnement permet d'expliquer ces oppositions de phases entre ces espèces. Des études récentes ont montré que le rythme d'expression des gènes horloges dans les neurones des SCN est similaire chez le rat, un rongeur nocturne, et chez *Arvicanthis ansorgei* un rongeur diurne. Plusieurs équipes avancent donc l'hypothèse que c'est en aval des SCN dans les signaux de sorties de l'horloge que se situe cet interrupteur. Nous savons que les neurones monoaminergiques sont actifs pendant la période de veille des individus et devraient être en antiphase entre un nocturne et un diurne.

Pour vérifier cette hypothèse, le premier objectif de ce projet sera de comparer le profil d'expression journalier de gènes codant pour des enzymes clés dans la synthèse de la noradrénaline et de la sérotonine chez le rat (nocturne) et l'*Arvicanthis ansorgei* (diurne). Par ailleurs, il a été démontré chez le rat que les neurones sérotoninergiques ont un fonctionnement rythmique sous contrôle de la sécrétion journalière des glucocorticoïdes. Ces hormones sont produites par les glandes surrénales situées au-dessus des reins. Dans un deuxième temps nous analyserons chez *Arvicanthis* le rôle joué par les glucocorticoïdes circulants sur le rythme d'expression de ces enzymes clés après ablation de ces glandes ou surrénalectomie.

Pour cela nous utiliserons au maximum 80 *Arvicanthis* sur 2 ans. Ce nombre inclut les animaux nécessaires à l'expérience mais également les animaux nécessaires à la mise au point de la surrénalectomie chez *Arvicanthis*.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car les rythmes sont générés et contrôlés par un système d'horloges centrales interconnectées dont le chef d'orchestre est les SCN. En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 15 par groupe expérimental pour obtenir des résultats statistiquement valides (Test ANOVA) en tenant compte des pertes possibles lors de la chirurgie (10-15% estimés chez le rat) et de la non consanguinité des *Arvicanthis*. En termes de raffinement, le milieu de vie des *Arvicanthis* sera enrichi avec un nid (frisure) et un barreau à ronger. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (surrénalectomie) le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques).

L'importance de la rythmicité circadienne dans la santé humaine et le bien-être est de mieux en mieux caractérisée. Les perturbations des fonctions circadiennes sont connues pour entraîner des troubles métaboliques (obésité, diabète), des problèmes cardiovasculaires, et même certains cancers (par ex., cancer du sein chez les femmes en travail posté). La conception de stratégies pour traiter, prévenir ou retarder ces perturbations est un nouveau défi pour la science et la médecine. La plupart des connaissances en chronobiologie a été obtenue chez les rongeurs nocturnes (c'est-à-rats, souris et hamsters). Compte-tenu de la nature diurne de la vie humaine, ces données ne peuvent pas être appliquées directement dans un contexte biomédical.

Comprendre comment fonctionne le système circadien chez un rongeur diurne par rapport à un rongeur nocturne est donc une condition nécessaire pour des applications biomédicales appropriées.

5881. Quatre-vingt-dix pourcent des patients atteints de cancer décèdent de leurs métastases. Les cancers colorectaux (CRC) représentent la deuxième cause de mortalité liée au cancer et le péritoine est le deuxième site métastatique chez ces patients (carcinose péritonéale (CP)). Notre laboratoire a identifié à partir d'épanchements de patients atteints de CP que les cellules tumorales disséminaient sous forme de cellules indépendantes ou de larges sphères regroupant plusieurs centaines de cellules

cohésives, ces dernières étant largement prédominantes. L'objectif de cette étude est de caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion du péritoine par des sphères tumorales présentant deux morphologies distinctes, ainsi que de comparer leur potentiel métastatique.

Nous modélisons le matériel tumoral retrouvé dans les effusions de patients en utilisant deux modèles d'organoïdes (petits fragments de tumeurs) préparé à partir de la collection Patient-derived xenografts (PDX) correspondant à des tumeurs humaines xénotransplantées sur souris immunodéprimées. Nous les préparons de façon à obtenir des sphères polarisées et étudions leurs propriétés invasives par deux approches indépendantes : 1) nous étudions les molécules impliquées dans l'invasion *in vitro* dans des gels tridimensionnels (3D) de collagène, 2) nous évaluons leur potentiel métastatique *in vivo* après injection intrapéritonéales dans des souris immunodéprimées. L'utilisation d'animaux pour répondre à ces questions est indispensable puisqu'ils représentent le seul modèle permettant de mimer au plus près ce qui est retrouvé chez les patients.

Cette étude requiert des souris pour amplifier les modèles PDX en xénotransplantes sous-cutanées qui nous permettront de générer les organoïdes (6 modèles soit 720 souris sur 3 ans) et réaliser les injections intrapéritonéales de façon à comparer la croissance tumorale par bioluminescence (6 modèles soit 185 souris).

Le développement de ces méthodes s'inscrit pleinement dans la mise en place de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux, puisqu'une grande partie des expériences seront faites sur des explants *ex vivo* (organoïdes) et par des tests d'invasion *in vitro* (gel 3D collagène), ce qui permet, entre autres, d'utiliser moins d'animaux, pour effectuer des panels de tests et de caractérisation très importants (réduction et remplacement). Une planification statistique a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude. Le nombre total de souris pour ce projet est de 905 souris sur 3 ans.

Toutes les interventions seront faites sous anesthésie et en assurant une analgésie. L'hébergement comprendra un enrichissement sous forme de « cocoons ».

5882. Les cellules du cerveau sont entourées d'un liquide appelé milieu interstitiel qui contient de nombreuses molécules métaboliques comme le glucose ou le lactate ainsi que des traces de neuromédiateurs libérés par les neurones. L'analyse chimique de la composition du milieu interstitiel peut révéler d'importantes informations sur le fonctionnement du système nerveux central ainsi que d'éventuels dysfonctionnements de populations de neurones ou de cellules gliales. La plate-forme technologique met au point des systèmes de capteurs très peu invasifs permettant de quantifier *in vivo* la concentration de molécules d'intérêt dans le milieu interstitiel du cerveau et de monitorer leurs changements au cours du temps. Elle propose des prestations consistant à monitorer les concentrations de glucose, lactate, D-sérine, glutamate, peroxyde d'hydrogène ou monoxyde d'azote (NO) grâce aux microélectrodes qu'elle a conçues. Ces prestations sont destinées aux laboratoires de neuroscience Français ou étrangers, qui peuvent envoyer leurs animaux, rats ou souris, qui ont été préalablement modifiés, soit génétiquement, soit par un traitement par des vecteurs viraux ou agents pharmacologiques. Les analyses réalisées par la plate-forme permettent de mieux comprendre l'impact des modifications induites par le laboratoire client sur le fonctionnement du système nerveux central. Ces analyses sont réalisées chez des rats ou souris traitées en amont selon des procédures agréées par le laboratoire client, et transportées sur le site de la plate-forme par transporteur agréé. La plate-forme réalise ses analyses du milieu interstitiel chez l'animal anesthésié avec administration d'agents analgésiques visant à réduire la douleur au maximum. Toutes les procédures sont terminées par l'euthanasie de l'animal et le nombre d'animaux est réduit à un minimum compatible avec des analyses statistiques fiables. Dans le cadre de ces prestations, la plate-forme utilisera un maximum de 300 souris et 100 rats mâles et femelles. Ce travail d'analyse du milieu interstitiel sur les modèles animaux provenant d'autres laboratoires contribuera à mieux comprendre l'impact de modifications génétiques sur le fonctionnement du cerveau, une tâche appelée phénotypage qui représente une priorité scientifique dans l'Union Européenne.

5883. La recherche en Neurosciences vise à approfondir les connaissances dans l'étude du cerveau et des pathologies associées. Ce projet s'intéresse à la libération de radicaux libres dans le cerveau qui pourraient être une cause de lésions neurologiques liées au vieillissement et au stress cellulaire. Le but de ce projet sera de valider pour la première fois le fonctionnement de micro-capteurs (de 7µm de diamètre) permettant la détection du monoxyde d'azote (NO), un radical libre remplissant des fonctions de neuromodulateur. Cette petite molécule lipophile franchit facilement les membranes biologiques et peut modifier chimiquement les protéines et les lipides constituant les neurones. Ce neuromédiateur est impliqué de façon physiologique dans la modulation de la transmission synaptique et de l'activité des réseaux de neurones, et pourrait être un médiateur des mécanismes de la mémoire. Mais cette molécule est aussi à l'origine de processus neurotoxiques impliqués dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou encore dans les lésions neurologiques produites par les agressions cérébrales aiguës comme les accidents vasculaires cérébraux. Cette neurotoxicité peut être reproduite *in vivo* par l'injection de N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans le parenchyme cérébral. Ces micro-capteurs ont été mis au point après deux années de développement *in vitro*. Ils seront maintenant validés chez l'animal et utilisés pour mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la libération de NO dans le cerveau. Ce projet utilisera un total de 120 rats mâles et femelles sur trois ans. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour permettre une interprétation statistique des résultats. L'ensemble des expérimentations décrites dans ce projet sera effectué sous anesthésie générale sans réveil avec analgésie générale et locale au niveau du scalp pour réduire la souffrance des animaux. De plus, des expérimentations *ex vivo* réduisant le recours aux animaux vivants ont été prévues pour les phases du projet permettant ce type de préparation.

5884. La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration sont étudiés chez l'animal: son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination.

Les chiens sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé animale (espèce cible) et humaine.

En tant que sous-traitant de l'industrie pharmaceutique, nous proposons à nos clients de réaliser la phase expérimentale de leurs études.

L'enjeu de ce projet est donc la réalisation des études de pharmacocinétique chez les chiens, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins par ponction directe.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 400 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaire, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 3600 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par ponction avec une aiguille à la veine jugulaire, à la veine céphalique ou à la saphène.

5885. Les éleveurs équins sont amenés à soigner des animaux malades ou à utiliser des médicaments de manière préventive. Pour les équins, des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits dans les tissus destinés à la consommation humaine. Ces études permettent de fixer le temps pendant lequel l'animal ne doit pas être consommé suite à l'administration d'un médicament vétérinaire.

La procédure consiste à l'administration du médicament dans les conditions normales d'utilisation. Elle est suivie par des prélèvements de différents tissus et par l'analyse du (des) produits dans ces échantillons de tissus. 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.

L'hébergement s'effectue dans des conditions normales d'hébergement de ces animaux.

Le but du projet est de tester 10 formulations. Le nombre d'animaux inclus pour tester chaque formulation est généralement 20 (4 animaux par temps d'abattage, 5 temps d'abattage) soit 200 animaux utilisés sur 5 ans.

5886. Les animaux modèles sont communément utilisés pour mieux comprendre la pathogenèse de divers types de rétinopathies humaines, d'autant plus que les maladies rétinienne sont parmi les principales causes de cécité. Le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) est un modèle bien caractérisé qui récapitule les caractéristiques de la rétinopathie chez le prématuré. La souris est une espèce nidicole dont la rétine est immature à la naissance à terme. C'est donc un bon modèle pour le suivi de la maturation rétinienne depuis le début de l'exposition à des stress oxydatifs exogènes par des niveaux élevés d'oxygène (comme modèle de la rétinopathie du prématuré humain induite par l'oxygène). Le protocole consiste à introduire des souriceaux nouveau-nés 7 jours après leur naissance (P7) dans un caisson où l'atmosphère est contrôlée à 75 % d'oxygène pendant 5 jours puis de les replacer en atmosphère à 21% d'oxygène. Il a été proposé que les voies moléculaires sur lesquelles nous travaillons (dites Wnt) seraient impliquées dans le contrôle du développement des pathologies vasculaires rétinienne. Dans le groupe nous avons développé différents mutants transgéniques de ces voies et des outils protéiques (anticorps, protéines recombinantes). Nous voulons tester dans ce projet nos hypothèses de l'implication de cette voie Wnt dans les pathologies rétinienne induites par l'oxygène.

Dans ce projet nous respecterons la règle des 3R :

Remplacer : Lorsque cela est possible, les études sont réalisées *in vitro* en particulier lorsqu'il s'agit de comprendre les interactions entre les différents récepteurs frizzled et les éléments de la voie de signalisation Wnt, ainsi que les effets sur la fonction cellulaire. Lorsqu'il s'agit d'étudier le rôle des différents partenaires de la voie sur la formation des vaisseaux, il n'existe pas de modèle *in vitro* pour obtenir ces informations. La formation du réseau vasculaire est un phénomène actif et dynamique impliquant l'interaction de plusieurs types cellulaires selon l'étape de formation. Le développement de la vascularisation implique l'interaction de plusieurs types cellulaires : cellules vasculaires, inflammatoires et environnement neuronal qui sécrètent des morphogènes. D'autre part, le flux sanguin est un autre facteur nécessaire à la formation de ce réseau. Ces phénomènes complexes ne peuvent pas être étudiés ou modélisés *in vitro*. Aussi le modèle *in vivo* est absolument nécessaire et indispensable pour une étude permettant la prise en compte des éléments dynamiques.

Réduire : Dans ce protocole nous utiliserons un nombre bien défini d'animaux permettant une interprétation des résultats et une utilisation la plus limitée des animaux. Pour définir l'effet de la délétion de gènes impliqués dans la voie Wnt/fzd nous utiliserons 4 lignées de souris transgéniques. Pour chaque lignée 70 animaux seront utilisés. Pour tester l'effet d'inhibiteurs sur la pathologie nous utiliserons des souris C57BL/6/J : 3 types d'inhibiteurs seront étudiés. Pour chaque inhibiteur 70 animaux seront utilisés. Soit un total de 490 animaux.

Raffiner : Les mesures destinées à réduire la souffrance causée aux animaux seront mises en place par la définition des points limites pour chaque procédure.

5887. La thématique de notre équipe de recherche est la compréhension physiopathologique des rhumatismes inflammatoires chroniques, et tout particulièrement de la Spondylarthrite Ankylosante (SPA). La SPA est une maladie fréquente, touchant 0,45% de la population adulte en France, soit environ 200.000 personnes et aujourd'hui peu de traitements sont efficaces. Une des caractéristiques génétiques de cette maladie est la présence d'une molécule à la surface de certaines cellules, le HLA-B27. En effet, la présence de celle-ci multiplie par 100 le risque de développer cette pathologie. Cette association (SPA/HLA-B27) a été démontrée il y a plus de 30 ans, cependant, et malgré de nombreuses recherches, nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle la raison pour laquelle le HLA-B27 confère cette prédisposition. Il existe plusieurs modèles animaux pour l'étude de cette maladie (rat/souris). Le modèle animal le plus étudié permettant d'étudier de la plupart des phénomènes cliniques observés chez les patients est le rat génétiquement modifié (transgénique) portant le HLA-B27. Ce modèle est considéré comme un des modèles les plus pertinents de la pathologie. En effet chez ce rat surviennent spontanément toutes les manifestations de la Spondylarthrite Ankylosante : Inflammation intestinale chronique qui se manifeste par une diarrhée, atteintes articulaires de type arthrites aiguës, chroniques ou récidivantes, prédominantes aux pattes arrières; certains animaux développent également une inflammation de l'œil (uvéïte) et des testicules (orchite). Cependant, il existe aussi des souris génétiquement modifiées (transgéniques) pour ce gène qui de manière très intéressante ne développent pas la maladie comme cela a été trouvé chez le rat. Cette caractéristique permettrait d'étudier des questions de première importance d'une part fondamentales et d'autre part appliquées comme: 1) Le rôle de HLA-B27 en absence d'inflammation apparente et cela dans différentes cellules de l'immunité. 2) La souris possède-t-elle une protection particulière malgré cette modification génétique altérante dans le modèle rat ? Possibilité de trouver des cibles thérapeutiques protectrices. Il est donc primordial de pouvoir aborder ces questions dans ce modèle murin pour lequel les outils moléculaires de caractérisations des processus biochimiques et des populations cellulaires sont plus disponibles que dans le modèle rat. Les expériences proposées dans le cadre de ce protocole visent donc à étudier le rôle du HLA-B27 dans les cellules primaires mises en jeu dans cette pathologie en absence d'inflammation; et d'étudier le rôle intrinsèque de HLA-B27 exprimé par ces cellules immunitaires. Afin de diminuer le nombre d'animaux, nous mettrons au point des lignées de culture primaire, à partir des organes lymphoïdes prélevés (rate et ganglion) pour étudier certains mécanismes cellulaires et limiter le nombre de souris utilisées. Nous limiterons le nombre de souris utilisés à 6 animaux par expérience, pour un total de 750 souris utilisées dans le projet. Ce modèle animal n'engendrant pas de pathologie, aucune souffrance n'est observée chez ces souris. Elles seront donc élevées en conditions d'hébergement classiques avec toutes les précautions prises pour cette espèce.

5888. Au cours de la Spondylarthrite Ankylosante (SPA), le facteur génétique principal qui multiplie par 100 le risque de développer cette maladie est le HLA-B27. Cette association a été démontrée il y a plus de 30 ans, cependant, et malgré de nombreuses recherches, nous ne savons toujours pas à l'heure actuelle la raison pour laquelle le HLA-B27 confère cette prédisposition. Il existe plusieurs modèles de la maladie chez la souris mais qui majoritairement ne reproduisent qu'une partie de la pathologie humaine. Un seul modèle animal permet l'étude de la plupart des phénomènes cliniques observés chez les patients, le modèle du rat transgénique HLA-B27. Ce modèle est considéré comme le modèle le plus pertinent de la pathologie. Dans ce modèle surviennent spontanément toutes les manifestations de la spondylarthrite ankylosante (inflammation intestinale chronique qui se manifeste par une diarrhée, atteintes articulaires de type arthrites aiguës, chroniques ou récidivantes, prédominant aux pattes arrière dont la survenue est aléatoire ; certains animaux développent également une inflammation de l'œil (uvéïte) et des testicules (orchite). Notre objectif principal est la compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie en utilisant ce modèle animal. La dissection des mécanismes impliqués dans l'association HLA-B27/SPA revêt une importance toute particulière car la spondylarthrite est une maladie fréquente, touchant 0,45% de la population adulte en France, soit environ 200.000 personnes. De plus, peu de traitements sont efficaces à l'heure actuelle. Des études de notre laboratoire utilisant le modèle de rats transgéniques qui expriment le gène HLA-B27 (soit sur le fond génétique FISHER soit sur le fond LEWIS) et qui développent la spondylarthrite ont révélé le rôle crucial des cellules dendritiques et des lymphocytes TCD4+ dans le déclenchement de la maladie. Cependant les mécanismes précis impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore élucidés. Un objectif majeur de notre projet est d'étudier plus précisément les conséquences de l'expression du gène HLA-B27 dans ces deux types cellulaires. Une meilleure compréhension du rôle pathogène du HLA-B27 vis à vis de la maladie peut conduire à la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les expériences consisteront à comparer les rats malades (transgéniques) à des rats contrôles (non-transgéniques ou portant un transgène contrôle non associé à la maladie : le HLA-B7). Pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, les organes (rate et ganglions principalement mais aussi intestin, *cæcum*, colon, yeux.) et pattes de chaque rat seront prélevés après sacrifice par asphyxie au CO2 pour ensuite être utilisés par les différents expérimentateurs à des fins différentes. Dès que possible, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons aussi des lignées de culture primaire établies dans notre laboratoire pour disséquer des mécanismes cellulaires *in vitro*. Etant donné que les deux caractéristiques majeures de la SPA chez le rat HLA-B27 sont l'apparition d'une diarrhée aiguë (colite) vers 6 semaines d'âge et d'une inflammation au niveau des articulations (arthrites) vers 10-12 semaines d'âge, nous pourrions, selon le projet, nous limiter à observer seulement une amélioration ou une aggravation du symptôme le plus précoce (à savoir la diarrhée) et ensuite sacrifier les animaux afin de limiter leur souffrance. Pour les expériences *ex vivo*, nous comptons utiliser en moyenne 6 animaux par expérience (2 rats HLA-B27, 2 rats contrôles non transgéniques et 2 rats contrôles HLA-B7, allèle non associé à la maladie), ce qui représente 240 rats par an (et 1200 rats sur 5 ans). Des données récentes de notre laboratoire ont révélé le rôle crucial de la molécule ICOS dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T chez les rats HLA-B27. Grâce à une collaboration, nous prévoyons d'établir une lignée de rat HLA-B27 avec la mutation du gène ICOS générée (rat HLA-B27-ICOS-KO). Si une protection vis-à-vis du développement de la SPA est observée chez ces animaux, et dans le but de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique, un traitement avec un anticorps anti-ICOS sera envisagé. Pour ces expériences nous aurons 4 groupes (rats transgéniques et rats contrôles traités par anti-ICOS ou le véhicule : PBS), avec 8 animaux par groupe, ce qui représente 32 animaux par essai. D'autres projets en cours dans le laboratoire pourront conduire à d'autres essais cliniques, utilisant un nombre similaire d'animaux.

5889. L'aquaculture représente une alternative aux prélèvements de poissons sauvages dans la nature pour l'alimentation humaine. La carpe est l'espèce la plus importante en masse pour la pisciculture à l'échelle mondiale. Pour améliorer les conditions d'élevage des animaux, diminuer ou annuler l'impact des maladies et contribuer à rendre l'aquaculture plus "durable", le développement de vaccins et la sélection d'animaux naturellement plus résistants constituent les deux approches majeures.

Ce projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes de défense des poissons contre leurs pathogènes pour développer de nouveaux vaccins contre des virus pour lesquels aucun vaccin n'est disponible ou pour lesquels les vaccins disponibles ne sont pas parfaitement efficaces. Les effets induits par l'infection expérimentale et/ou la vaccination sur les poissons sont analysés par différentes approches immunologiques et moléculaires.

Nous prévoyons d'utiliser au total 950 poissons pour ce projet qui se décline en 3 procédures qui pourront être répétées.

Les expériences sont de deux types : (1) sur de jeunes carpes pesant de 2 à 10 g, des immunisations expérimentales/vaccinations sont effectuées par bain ou par injection puis (2) des infections expérimentales par bain ou injection sont pratiquées pour tester l'efficacité et les modalités de la vaccination; l'analyse des modalités de la réponse immunitaire sur les tissus prélevés post-mortem ou sur le sérum est également effectuée.

Les expériences durent de 3 à 6 semaines pour les infections expérimentales; pour les vaccinations, les animaux sont gardés le temps que la réponse immunitaire non spécifique soit très atténuée, c'est à dire entre 2 et 6 mois selon les protocoles. Les groupes sont de 10 animaux pour effectuer les prélèvements de tissus ou de 30 pour évaluer l'efficacité de l'immunisation.

Les prélèvements sont faits post-mortem (sauf prélèvements de sang).

L'ensemble des procédures proposées ne pourrait être mis en œuvre dans des modèles *in vitro*, dans la mesure où les propriétés de sensibilité, ou de réponse aux infections sont à l'échelle de l'individu, et dans une dynamique temporelle de quelques semaines à quelques mois; toutes les procédures sont définies et validées et sont mises en œuvre dans le souci de respecter la règle des 3R.

- les lignées cellulaires (*in vitro*) sont utilisées chaque fois que cela est possible par exemple pour pré-évaluer l'activité d'adjuvants/stimulants du système immunitaire.

- nous veillons à réduire les effectifs de poissons autant qu'il est possible pour obtenir des résultats significatifs, en tenant compte des mortalités estimées

- nous effectuons les expériences dans un environnement optimal pour les animaux. Les animaux sont gardés en lots et constituent les uns pour les autres un élément important d'enrichissement du milieu. Il doit être noté qu'il est important de ne pas introduire dans les bacs des objets sur lesquels les poissons se frottent: même lorsqu'ils ne se blessent pas ce faisant, l'intégrité du mucus est souvent altérée ce qui fragilise l'animal.

5890. La perte de substance osseuse est un problème difficile à résoudre en médecine humaine en raison notamment des lésions des parties molles et de la fréquence d'une infection associée et touchent de nombreuses personnes en France et dans le monde. La principale cause de ces pertes de substances osseuses est secondaire à des traumatismes, liée à des chutes, des accidents, des accidents de la voie publique, des blessures par balle, mais également lors de complications de pathologies dentaires comme la maladie parodontale. Les techniques de reconstruction osseuse actuelles comprennent les greffes traditionnelles, les transferts vascularisés et les techniques de mobilisation osseuse, entraînant dans 93 % des cas, une consolidation osseuse dans un délai moyen de 14,7 mois. Cependant ce délai de consolidation osseuse de plus de 14 mois est très long et de nombreuses complications sont décrites (infection notamment) entraînant un échec de la solidification osseuse.

De nouvelles voies de reconstruction osseuse sont donc à l'étude, permettant de diminuer le temps de cicatrisation osseuse, avec de nouvelles solutions à base de matériau fonctionnalisé permettant une reconstruction osseuse efficace et rapide.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution au cours du temps de matériaux fonctionnalisés de reconstruction osseuse dans un modèle de défaut osseux créé au niveau des membres inférieurs et des muscles lombaires chez la brebis.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de substituts de greffe osseuse implantés dans un défaut osseux ou un muscle dans un organisme entier vivant. En effet, le comportement du substitut de greffe osseuse dépend de très nombreux facteurs tels que la zone du défaut, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc. Le modèle de défaut osseux critique, réalisé chez la brebis est un modèle largement décrit dans la littérature car la taille des os des membres pelviens est proche de celle de l'homme, permettant une utilisation translationnelle aisée des techniques et matériaux utilisés chez l'animal. 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 la réalisation de ce modèle, des méthodes d'anesthésie et d'analgésie seront mises en place (avant, pendant et après la chirurgie) sur chaque animal afin de garantir son état de santé et de bien-être. De plus, afin de prévenir les infections, un traitement antibiotique sera mis en place. Après la chirurgie, une période de soins et d'attentions cliniques postopératoires sera réalisée pendant 7 jours minimum afin de détecter tout signe clinique anormal ou anorexie et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate.

L'imagerie médicale et notamment l'imagerie scanner sera utilisée pour suivre la reconstruction osseuse. C'est une technique non invasive et non douloureuse qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude (R de Réduire).

Lors de ce projet, 5 études d'efficacité de nouveaux matériaux fonctionnalisés seront réalisées. Pour chacune de ces études, 24 brebis seront utilisées, soit un total de 120 animaux.

5891. La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurologique chronique et progressive responsable de troubles essentiellement moteurs. Les causes de la maladie sont mal connues, mais plusieurs pistes existent. L'hypothèse la plus plausible est une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques prédisposant. La maladie débute habituellement entre 45 et 70 ans et représente la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (prévalence de 150 000 patients en France). La MP est caractérisée par la destruction progressive des neurones à la dopamine dans une structure du cerveau impliquée dans le contrôle des mouvements du corps, la substance noire *pars compacta* (SNc). Les processus biologiques suspectés d'entraîner la perte neuronale sont multiples : dysfonctionnement mitochondrial, apoptose, accumulation de protéines neurotoxiques, stress oxydatif... Un dysfonctionnement des transporteurs des acides-aminés excitateurs (TAAEs) du cerveau, jouant un rôle crucial dans la prévention de l'excitotoxicité et le maintien des taux de glutathion (le majeur antioxydant dans le cerveau), semble aussi être impliqué. Dans ce contexte, nous avons montré chez le rat que le blocage aigu de ces transporteurs par une molécule, le PDC, déclenche une perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNc ainsi que plusieurs processus neuropathologiques décrits dans la MP. L'injection de cette molécule au niveau de la SNc chez le rat représente un modèle progressif de la maladie induit de façon aiguë. Ce modèle permettra d'étudier le décours physiopathologique de la maladie chez l'animal, et d'évaluer les effets de différents traitements existants ou innovants, notamment leur capacité de ralentir la progression des processus neuropathologiques (effet disease-modifying).

Dans ce contexte, nous proposons d'utiliser une technique d'investigation IRM non irradiante, non invasive, n'entraînant pas de douleur ou de souffrance chez l'animal anesthésié, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette méthode permet de détecter et de doser dans différentes structures du cerveau un certain nombre de molécules impliquées dans le fonctionnement cérébral normal. L'application de cette méthode permettra de mieux caractériser les modifications biochimiques induites chez ce modèle rat de la MP. Le premier avantage de l'imagerie RMN *in vivo* est la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes chez le même animal au cours de sa pathologie. Le second avantage tient au fait que la technologie utilisée est identique à celle utilisée chez l'Homme, permettant ainsi une recherche biomédicale translationnelle.

Des données préliminaires obtenues sur ce modèle PDC semblent indiquer qu'une hyperactivité du noyau sous-thalamique (NST) serait impliquée dans le processus neurodégénératif et/ou dans la bilatéralisation de la perte neuronale. Il serait donc intéressant de mieux caractériser le rôle du NST dans ce contexte, vu son implication à la fois dans les symptômes de la MP et les thérapies antiparkinsoniennes. Nous envisageons donc, dans un deuxième temps, d'étudier l'effet neuroprotecteur que pourrait apporter la lésion du NST par l'injection *in situ* d'acide iboténique.

Enfin la dernière phase de ce projet vise à évaluer l'effet d'une stratégie thérapeutique sur le décours de la MP. La stimulation cérébrale profonde (SCP) du NST s'est imposée, depuis une quinzaine d'année, comme un traitement symptomatique efficace de la MP aux stades avancés, auxquels le traitement de référence à la L-DOPA induit à long terme des effets indésirables sévères. De plus, il y a des données de la littérature et issues de notre équipe suggérant que la SCP du NST aurait un effet neuroprotecteur ou favorisant la survie neuronale. Dans le même contexte, nous appliquerons la SCP du NST chez un groupe d'animaux traités au PDC pour évaluer son impact potentiel sur la neurodégénérescence progressive et ainsi de présager une indication plus précoce de la SCP du NST dans le traitement de la maladie afin de ralentir le processus dégénératif.

La règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) sera appliquée conformément au décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Pour cette étude, nous envisageons d'utiliser 90 rats répartis dans différents groupes. Ils seront hébergés dans des cages aux standards européens (surface au sol de 1500 cm², nourriture et eau *ad libitum*) par groupes de 4 animaux (constituant un enrichissement social) avec environnement enrichi (balles, boules de papiers, ronds de cartons...). Ces animaux seront conservés pendant toute la durée de l'étude dans une animalerie aux conditions contrôlées (température, hygrométrie, luminosité, bruit) à proximité directe du centre IRM où seront pratiquées toutes les mesures par spectroscopie. Toute intervention chirurgicale sera pratiquée sous anesthésie profonde et des analgésiques administrés en péri-opératoire.

5892. La plupart des cancers peuvent métastaser dans le tissu osseux et les métastases osseuses représentent un véritable défi en cancérologie. Les métastases osseuses signent la gravité de la maladie cancéreuse et sont associées à des douleurs intenses ainsi que des fractures osseuses qui peuvent mettre en jeu le pronostic vital des patients. Malgré les progrès de l'imagerie, de la chirurgie, de la radiothérapie et l'arrivée de nouvelles chimiothérapies, les métastases osseuses conservent un très mauvais pronostic, et ceci quelle que soit leur origine. De fait, de nouvelles stratégies se doivent d'être explorées pour améliorer la prise en charge thérapeutique des lésions tumorales osseuses

Les globules blancs (GBs) représentent des acteurs clefs de la réponse immunitaire anti-tumorale sachant que ces cellules sont capables de reconnaître/détruire les cellules cancéreuses. Dans de nombreux cancers, les GBs sont faiblement représentés et/ou inactifs. Les chimiokines sont des molécules normalement produites par l'organisme permettant aux GBs de patrouiller dans les tissus et de jouer un rôle de sentinelle. Dans de nombreux cancers, la production de chimiokines est altérée expliquant en partie, la faiblesse du système immunitaire à reconnaître/détruire les cellules cancéreuses. Par ailleurs, l'activation des GBs est régulée par un ensemble de signaux co-activateurs et de signaux co-inhibiteurs appelés checkpoints immunologiques. Des découvertes récentes en cancérologie ont révélé que les cellules cancéreuses étaient capables de manipuler le système immunitaire au niveau des checkpoints dans le but de paralyser les GBs. De nouveaux traitements anticancéreux ont été développés pour cibler ces checkpoints et ont donné des résultats spectaculaires en termes de régression des tumeurs notamment dans le mélanome métastatique.

Notre projet qui nécessitera un total de 1248 souris a pour objectif d'évaluer dans des modèles précliniques murins de métastases osseuses d'origines différentes (cancer du poumon, cancer du rein) les effets de traitements associant deux stratégies anticancéreuses, l'une visant à favoriser, à l'aide d'une chimiokine, un recrutement sélectif de GBs dans la tumeur, l'autre visant à neutraliser les checkpoints immunitaires à l'aide d'anticorps spécifiques.

D'un point de vue expérimental, nous nous proposons d'utiliser les lignées cancéreuses murines LL2 (cancer pulmonaire) et Renca (cancer du rein) qui, injectées dans le fémur des souris, reproduisent le contexte de métastases osseuses des cancers du poumon ou du rein.

En termes de remplacement, Il n'y a pas actuellement de méthodes alternatives *in vitro* permettant de reproduire l'environnement immunitaire d'une tumeur. De plus, l'environnement immunitaire d'une tumeur d'origine pulmonaire versus rénale étant différent, nous oblige de fait à développer les 2 modèles précliniques.

En termes 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 dans des cages enrichies avec un igloo et des tiges/carrés de coton afin de limiter au maximum leur stress. Les animaux reçoivent un traitement antidouleur pendant toute la durée de l'expérimentation. Les animaux sont visités régulièrement afin 1-de détecter tous signes de souffrance/inconfort et 2- de mettre en place des traitements/solutions adaptés aux problèmes identifiés.

5893. L'obésité, un problème de santé publique, est liée à un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux parmi lesquels la nutrition joue un rôle majeur. Elle peut notamment permettre, via une stratégie alimentaire adaptée, de limiter, voire même de prévenir, les désordres métaboliques associés à ces maladies comme l'altération du métabolisme des lipides et l'instauration d'une inflammation à bas bruit. Nos travaux récents ont contribué à montrer que lors d'une alimentation riche en lipides, des lipopolysaccharides (LPS, aussi appelés endotoxines) du microbiote intestinal (composés de la paroi des bactéries Gram négatives) sont absorbées et peuvent contribuer au développement de l'inflammation lors de ces maladies. Ainsi, l'étude des lipides : structure, digestion, absorption, stockage et utilisation, en lien avec le métabolisme des endotoxines, est une voie à explorer.

La digestion des lipides implique l'action de la bile, sécrétion exocrine du foie. Lors de la consommation d'un régime riche en graisse, la production d'acides biliaires est augmentée pour faciliter la digestion des lipides. De plus, la composition des sécrétions biliaires est modulée selon le régime alimentaire ingéré et pourrait influencer l'absorption des endotoxines.

L'objectif du projet de recherche est d'étudier l'effet relatif de la qualité/quantité de différents lipides alimentaires sur les sécrétions biliaires, l'absorption intestinale des endotoxines en lien avec l'inflammation dans le cadre des maladies métaboliques associées.

Cinq groupes de souris seront soumis à différents régimes alimentaires: un témoin et 4 régimes tests se différenciant par leur qualité et quantité de lipides.

Avec un premier lot de souris de souche C57Bl6/J, nous étudierons les processus inflammatoires associés à l'endotoxémie pour ces différents régimes lipidiques par analyse de prélèvements sanguins par veine porte et intracardiaque sous anesthésie gazeuse profonde et sans réveil. Avec un deuxième lot de souris de souche Swiss, nous réaliseront une analyse des sécrétions biliaires. Ces sécrétions seront là encore prélevées sous anesthésie gazeuse profonde et sans réveil. Un total de 120 souris sera utilisé dans le cadre de ce projet.

Le nombre d'animaux sur l'ensemble du protocole a été réduit au maximum. Pour leur bien-être, leur comportement social sera stimulé par une stabulation collective (4 à 5 souris / cage) dans un environnement adapté et enrichi.

Les régimes tests ont été établis de façon à couvrir la totalité des besoins nutritionnels des animaux. Ils entraîneront une prise de poids supérieure au régime témoin, mais au vue des études précédentes, sur 4 semaines, ils n'induisent ni obésité, ni mal-être chez les animaux. Néanmoins, en plus de l'observation quotidienne, une surveillance régulière (deux fois par semaine) de leur prise alimentaire et de leur poids sera mise en place.

Mots clés: obésité, lipides, inflammation, sécrétions biliaires.

5894. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une atteinte pulmonaire grave, sans traitement spécifique, associée à une inflammation alvéolaire et une dysfonction épithéliale. Une meilleure connaissance de sa physiopathologie est nécessaire pour améliorer sa prévention, son diagnostic et son traitement. Notre projet vise à caractériser les effets biologiques de la voie RAGE (récepteur des produits de glycation avancée) au cours de deux processus majeurs de l'agression alvéolaire et de sa résolution: la clairance liquidienne alvéolaire et l'inflammation alvéolaire. De nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques sont actuellement développées par notre équipe de recherche translationnelle à partir d'investigations *in vitro*, *in vivo* et de données cliniques. Le but de notre projet multidisciplinaire est de mieux comprendre les rôles de RAGE au cours du SDRA, d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer à terme la prise en charge des patients atteints de SDRA.

Dans ce cadre, nous utilisons depuis 3 ans un modèle d'atteinte pulmonaire chez la souris. Ce modèle de lésion épithéliale directe par instillation intratrachéale d'acide chlorhydrique nous a déjà permis de mieux décrire le rôle de la voie RAGE au cours de l'atteinte pulmonaire et de sa résolution, notamment en décrivant l'association entre l'altération de la clairance liquidienne alvéolaire et l'activation de la voie RAGE.

Nous renouvelons donc actuellement la demande d'autorisation pour la poursuite de l'utilisation de ce modèle, afin de poursuivre la description des implications biologiques et fonctionnelles de la voie RAGE et de sa modulation. Pour cela, le projet comporte l'étude de souris sauvages « Black 6 » sauvages (lignée C57BL/6JRj) et knock-out pour le gène RAGE (lignée déjà présente au sein de l'animalerie de notre institution). Selon les principes des « 3R », le projet est basé sur le recours à des méthodes

substitutives aux études *in vivo* pour certaines études, notamment les études mécanistiques sur modèles cellulaires dans notre cas, la réduction maximale du nombre d'animaux utilisés sur la base d'une étude statistique (nombre total, N=92), et l'optimisation des méthodes expérimentales afin de diminuer les contraintes imposées aux animaux.

Dans notre modèle, le jour de l'instillation intratrachéale d'HCl (ou de NaCl 0.9% dans le groupe « Sham ») définit le J0. Pendant la période suivant cette instillation (pouvant durer de quelques minutes à une heure environ), les souris (qui sont alors sous anesthésie générale) présentent des signes d'insuffisance respiratoire aiguë (*e.g.* polypnée ou bradypnée, tirage respiratoire), mais cette phase est résolutive grâce au maintien des animaux dans une enceinte oxygénée, réchauffée et humidifiée, pendant 4 heures. Les animaux retrouvent ensuite des conditions standard de stabulation, sans symptomatologie particulière. Les animaux sont étudiés à J0, J1, J2 ou J4 : après une période de 30 minutes de ventilation mécanique sous anesthésie générale, les animaux sont mis à mort avant réalisation de différents prélèvements biologiques. Les animaux étudiés à J0 ne sont pas réveillés de leur anesthésie générale entre l'instillation trachéale, la période de ventilation mécanique et la mise à mort. L'objectif de l'utilisation de notre modèle est de décrire l'efficacité et les mécanismes d'action de stratégies thérapeutiques visant à moduler la voie RAGE, sur la résolution de l'atteinte pulmonaire dans ce modèle expérimental de SDRA.

5895. Cette étude est un projet fondamental dans le domaine de la santé publique. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la deuxième cause mondiale de mortalité. En particulier l'AVC de nature ischémique représente plus de 80% des cas d'AVC et est caractérisé par la formation d'un caillot dans une artère cérébrale provoquant une diminution voire une suppression du flux sanguin dans une région du cerveau. L'hétérogénéité des causes d'ischémie, la complexité et la sensibilité du cerveau font encore de l'AVC une pathologie complexe à traiter et des règles standards de traitements sont difficiles à établir.

La première action thérapeutique consiste à rétablir le flux sanguin le plus rapidement possible afin d'éviter la mort neuronale et ainsi les séquelles irréversibles. Le traitement de référence reste le même depuis les années 1980 ; l'injection de rt-PA (forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène) qui entraîne la lyse du caillot. Toutefois, les critères d'inclusion des patients restent très limités, notamment à cause des complications hémorragiques résultant de l'utilisation du rt-PA seul.

La « vectorisation » du rt-PA fait référence à l'association de ce médicament à des matériaux qui présentent une affinité particulière pour le caillot et qui vont donc permettre l'accumulation préférentielle du rt-PA au site d'occlusion. Cette association permettrait notamment de diminuer la dose injectée, décroissant les risques d'effets secondaires associés au traitement.

Les matériaux qui seront utilisés dans cette étude sont synthétisés à partir de fucoïdane, un polymère naturel extrait d'algue brune. Il a en effet été établi que le fucoïdane présente une forte affinité pour un marqueur cellulaire exprimé par les composants du caillot ; la P-sélectine. Il pourra être modifié par des groupements chimiques ou formulé sous forme de nano ou microparticules une fois associé à d'autres polymères pour optimiser le chargement du rt-PA. Différentes formulations ont déjà montré *in vitro* leur capacité ; d'une part à s'associer au rt-PA et ; d'autre part à atteindre leur cible cellulaire.

Dans ce projet, des tests *in vitro* seront effectués en amont pour valider l'affinité des systèmes développés avec la P-sélectine sous conditions de flux physiologique, ce qui nous permet de respecter la règle des 3 R (remplacement).

Nous utiliserons 500 souris C57BL/6 mâles adultes (5-8 semaines). Un modèle de thrombose au chlorure de fer (FeCl₃) sera utilisé pour sa reproductibilité. De plus, la technique semi-quantitative de macroscopie intravitale nous permettra de visualiser en temps réel la formation de la thrombose et de réitérer l'induction du thrombus sur la même souris si celui-ci ne s'est pas développé. Ainsi, toutes les souris traitées seront incluses dans l'étude et des premières estimations devraient être fournies à partir d'un nombre limité de souris (4-5 souris). Les choix du mode d'induction et du mode d'observation nous permettent donc de respecter la règle des 3R (réduction et raffinement).

5896. De nombreuses circonstances nécessitent d'administrer des produits analgésiques chez le chien afin de réduire des sensations de douleurs. La recherche tente de développer de nouveaux analgésiques plus efficaces et avec un effet plus rapide pour une meilleure prise en charge des animaux.

Le but de ce projet est donc de tester en conditions réelles l'efficacité de différents traitements analgésiques chez le chien.

L'analgésiomètre est un appareil qui produit un point lumineux, d'une intensité choisie par l'expérimentateur, projeté sur une vitre qui produit alors un point de chaleur. L'animal est placé assis sur cette vitre et la mire est faite sur la peau du chien en arrière des coussinets plantaires des postérieurs de l'animal. Par réflexe lorsque la sensation de douleur apparaît, l'animal va retirer sa patte. Le temps entre le début de la stimulation et le retrait de la patte l'animal permet d'évaluer l'effet analgésique. Une durée maximale de stimulation de 30 secondes est fixée, afin de ne pas brûler la peau de l'animal.

A chaque session, 5 mesures sont réalisées par animal en alternant si possible les membres postérieurs.

Une phase de training (sans stimulation lumineuse) est nécessaire afin d'habituer le chien à se tenir correctement (assis) sur la vitre puis vient une phase de training avec stimulation à différentes intensités (1 à 2 séances par jour) jusqu'à obtenir une réponse répétable de l'animal pour une même intensité. Durant cette phase, une sélection des animaux par rapport à leur réponse (reproductibilité) est effectuée et une intensité lumineuse est sélectionnée pour chaque animal.

Pendant la phase d'évaluation de l'effet analgésique du produit, le chien sera soumis à maximum 5 sessions par jour.

En parallèle, un suivi du produit dans l'organisme (sang/plasma) est également possible.

Trois procédures expérimentales sont donc prévues dans ce projet : administration de différents traitements, stimulation par analgésiomètre et prélèvements sanguins répétés.

Seuls des chiens seront utilisés dans ce projet, et chaque prélèvement/administration se fera en nombre limité. Le nombre d'animaux par étude sera réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet lié à la variabilité

interindividuelle. Au total, 100 animaux pourront être utilisés en 5 ans. Ce nombre pourra éventuellement être réduit si les résultats préliminaires le permettent.

Ce type de projet ne nécessite normalement pas d'hébergement individuel, les animaux seront donc en collectivité avec un enrichissement du milieu adapté. Cependant, il pourra arriver en fonction des effets secondaires attendus des traitements et de la voie d'administration, que les chiens soient placés en hébergement individuel pendant au maximum 4h après administration du traitement afin de suivre leur état de santé de manière individuelle (notamment afin d'observer d'éventuels vomissements, fèces molles).

5897. Chez l'homme, l'hyperactivité détrusorienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détrusoriennes involontaires pendant la phase de remplissage vésical, qui peuvent être spontanées ou provoquées ». On distingue deux types d'hyperactivité détrusorienne (HD) selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie n'est suspectée); ou (2) neurogène (HDN) quand il existe une cause neurologique identifiée (traumatisme médullaire etc.). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde notamment suite aux complications urologiques (incontinence), modifications urodynamiques, infections urinaires ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les premières causes de ré-hospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. La prévalence élevée, les conséquences psychosociales et les coûts relatifs à la prise en charge médicale font de ce syndrome un réel problème de santé publique.

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

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

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, le modèle préclinique le plus pertinent qui présente des caractéristiques similaires à celles observées dans la pathologie humaine est le rat ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI). Ce modèle de rats SCI a, par ailleurs, été précédemment employé pour évaluer l'effet des médicaments ou un dispositif de stimulation électrique pour le traitement de la NDO.

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

5898. Etude du rôle du récepteur TNFR 2 sur les lymphocytes Treg lors des états d'immunosuppression induite par le sepsis

Le sepsis est l'une des principales causes de décès chez les patients de moins de 40 ans. Cette infection généralisée s'accompagne d'une extinction des capacités de réaction du système immunitaire aussi appelée immunosuppression (IS). Cette IS prépare le terrain au développement d'infections bactériennes secondaires nosocomiales. La gestion de ces infections à l'hôpital conduit à une utilisation massive d'antibiotiques générant un surcoût pour la collectivité et favorisant l'émergence de souches multi-résistantes. Ainsi le sepsis engage un système complexe de défense de l'organisme, devant être adéquate, spécifique et transitoire, de façon à éviter une activation aberrante du système immunitaire. Les lymphocytes T régulateur (Treg) remplissent cette fonction de contrôle du système immunitaire. Au cours de l'IS post-septique, il est observé une extinction du système immunitaire associée à une activation excessive des Treg.

Le but de notre étude est de mieux comprendre le rôle des lymphocytes Treg dans ce phénomène d'immunosuppression induit par le sepsis.

Le TNF alpha est connu comme étant une cytokine produite par l'organisme au cours du sepsis et activant les systèmes de défense de l'organisme. Dernièrement, il a été montré que cette molécule pouvait moduler l'activité des lymphocytes Treg et ainsi jouer un rôle clé au cours de l'apparition tardive du phénomène d'IS. Le TNF joue un rôle central dans l'activation du système immunitaire inné et adaptatif via son récepteur ubiquitaire TNFR1. Il semble aussi responsable lors des phases plus tardives de l'activation et de l'expansion des lymphocytes Treg via son récepteur à leur surface le TNFR2.

Ce projet fait suite à une première étude « Etude du rôle du récepteur TNFR2 sur les lymphocytes Treg lors des états d'immunosuppression induite par le sepsis » où nos résultats préliminaires ont permis d'observer la mise en place d'une immunodépression systémique post septique (septicémie à *S. aureus*) avec activation et expansion des lymphocytes Treg TNFR2+.

L'étude des mécanismes d'activation et effecteur des lymphocytes Treg TNFR2+ au cours du sepsis semble donc une voie de recherche à poursuivre avec comme objectif la découverte de thérapeutiques innovantes (anticorps anti TNFR2) dans la problématique de la maîtrise du risque infectieux nosocomial, en complément des thérapeutiques anti- infectieuses.

Ce protocole se divise en 3 parties :

- 1) Partie 1 : Caractérisation de l'immunosuppression lors d'une infection généralisée.
- 2) Partie 2 : Etude du rôle du récepteur de type 2 TNFR2 exprimé par les lymphocytes T régulateur.
- 3) Partie 3 : Développement d'une stratégie thérapeutique d'inhibition du récepteur TNFR2 par l'utilisation d'anticorps neutralisants.

Pour cela, 1185 souris C57BL/6jRj avaient initialement été demandées. Suite aux résultats de l'étude préliminaire, 817 souris C57BL/6jRj, 264 souris C57BL/6-Tg(Foxp3DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax (DEREG), 60 souris OTII CD45.1 et 368 souris transgéniques C57BL/6jRj (TNFR2Treg KO) seront finalement nécessaires soit un total de 1509 souris femelles.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'effet immunosuppresseur du sepsis et le rôle correctif d'une biothérapie ciblée contre le TNFR2 ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de souris a été réduit au minimum nécessaire afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin l'état général des souris est évalué deux fois par jour pendant 3 jours pour dépister au plus tôt d'éventuels signes de souffrance (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement de certains individus par rapport au groupe). Une grille d'évaluation a été mise en place afin de détecter ces signes.

5899. Projet :

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones pléiotropes régulant à la fois le système immunitaire, la réponse au stress et le métabolisme énergétique. Notre groupe s'intéresse au rôle joué par les GC sur les cellules bêta pancréatiques, dont la principale fonction est de sécréter l'insuline, seule hormone hypoglycémiante.

Nous avons pu montrer que suite à un traitement chronique aux GC, la masse de cellules bêta est fortement augmentée, et principalement par la formation de nouveaux îlots. Nous avons également pu montrer que les effets des GC sur le pancréas sont indirects, et qu'un facteur circulant, présent dans le sérum des souris traitées aux GC, peut agir sur la néogenèse de cellules bêta. Nous pensons que suite au traitement par les GC, les organes cibles des GC comme le foie, le muscle ou le tissu adipeux vont produire un signal qui va agir sur le pancréas pour favoriser la formation de nouveaux îlots.

L'objectif du présent projet est de caractériser l'adaptation pancréatique en réponse au traitement aux GC dans différentes situations : suite à un traitement court (2-3 semaines) ou long (16 semaines) aux GC ; chez des souris âgées (1 an) ; chez des souris rendues insulino-résistantes grâce à un antagoniste du récepteur de l'insuline.

Type d'animaux : Souris mâles C57BL/6J

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 288 souris expérimentales pour une durée maximale de 1 an. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de réduction et de raffinement 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 : Notre projet vise à définir les conséquences de la modification de la signalisation des glucocorticoïdes dans les tissus périphériques sur la communication inter-organe avec le pancréas, mais également à identifier le facteur capable de stimuler la formation de nouveaux îlots pancréatiques. C'est un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre les cellules qui produisent l'insuline et celles qui y répondent. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire les interactions inter-organes. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet.

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats et dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. De plus, nous avons inclus dans certains protocoles des grilles de suivi de poids des animaux, avec une pesée hebdomadaire, voire bihebdomadaire, afin de déceler une perte de poids, qui serait signe d'une souffrance de l'animal.

5900. Le but de cette étude est de comparer l'activité anti-tumorale de l'Aflibercept et du Bevacizumab sur des xéno greffes de cancer colorectal humain HT-29 (naturellement résistant au Bevacizumab) et DLD-1 (sensible au Bevacizumab).

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

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 90 souris.

Nous espérons mettre en évidence que le traitement par l'Aflibercept permettra une diminution de la croissance tumorale dans la lignée sensible au Bevacizumab (DLD-1) à l'inverse de la lignée HT-29 résistante. Ces résultats confirmeraient nos précédents résultats sur 2 autres lignées sensible et résistante.

Type d'animaux : Souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 90 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.